

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“EVALUACIÓN EN CAMPO DE LA CASTRACIÓN
QUÍMICA EN PERROS USANDO GLUCONATO DE
ZINC”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Theresa Betsabé Tataje Arancibia

LIMA – PERÚ

2014

**Dedicado a la más increíble persona que ha podido existir y
que me enseñó muchas cosas a lo largo de su vida.
Gracias por tu paciencia, tu cariño, cuidados y por enseñarme a querer
y respetar a las personas y los animales.
Gracias por que siempre me impulsaste a querer ser mejor
“¡Gracias Abuelito!”**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. César Gavidia, director de esta tesis.

Mi más sincera gratitud por confiar en mí para la realización de este estudio.

¡Gracias por su apoyo y por su paciencia!

A mis padres y hermano.

Gracias por el apoyo y confianza que me brindan en todo momento;

Respaldándome día a día para alcanzar mis objetivos.

A Ani y Cindy

Gracias por viajar conmigo y ayudarme en la obtención de muestras. Nunca olvidaré su apoyo incondicional... ¡Gracias!

Al resto de familiares y amigos que participaron de alguna forma en la realización de ésta tesis.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.1 ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO	5
2.1.1 ESCROTO	7
2.1.2 TESTÍCULOS	7
2.1.3 EPIDÍDIMO Y CORDÓN ESPERMÁTICO	9
2.1.4 PENE	10
2.1.5 PREPUCIO	12
2.1.6 PROSTATA	12
1.2 FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO	13
2.2.1 ESPERMATOCITOGENÉESIS	14
2.2.2 ESPERMIOGÉNESIS	15
2.2.3 ESPERMIACIÓN	15
1.3 TESTOSTERONA BIOSÍNTESIS TRANSPORTE Y METABOLISMO	17
2.3.1 UTILIDAD CLÍNICA	18
2.3.2 MÉTODOS ACTUALES PARA LA DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA	18
1.4 TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN EN MACHOS	22
2.4.1 ORQUIECTOMÍA	23
2.4.1.1 CASTRACIÓN PRE-ESCROTAL ABIERTA	23
2.4.1.2 CASTRACIÓN PRE-ESCROTAL CERRADA	24
2.4.1.3 CASTRACIÓN PERINEAL	25
2.4.2 VASECTOMÍA	25

2.4.3	CASTRACIÓN QUÍMICA	28
	PROGESTAGENOS	28
	ANALOGOS DE GNRH	29
	AGENTES ESCLEROSANTES	29
2.4.3.1	GLUCONATO DE ZINC	31
	ESTUDIOS PREVIOS	33
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1	LUGAR	35
2.2	DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL	35
2.3	MUESTRAS	36
3.3.1	TAMAÑO DE LA MUESTRA	36
2.4	METODOLOGÍA	37
3.4.1	INYECCIÓN DE GLUCONATO DE ZINC	37
3.4.2	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	39
3.4.2.1	MEDICIÓN DE ATROFIA TESTICULAR	39
3.4.2.2	MEDICIÓN DE TESTOSTERONA	39
3.4.3	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	40
3.4.4	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	41
3.4.5	CONSIDERACIONES ÉTICAS	41
III.	RESULTADOS	42
IV.	DISCUSIÓN	49
V.	CONCLUSIONES	54
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
VII.	ANEXOS	64
	ANEXO 1	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN : Ácido Desoxirribonucleico.
- DHT : Dihidrotestosterona
- EIA : Inmuno Ensayo enzimático.
- EMIT : Ensayo inmunológico multiplicado por enzimas.
- ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay.
- FSH : Hormona Foliculoestimulante.
- GnRH : Hormona liberadora de gonadotropina.
- Kg : kilogramos
- LH : Hormona Luteinizante.
- Ng/ml : nanogramos/mililitros
- Proteína ABP : Androgen-bindingprotein o proteína ligadora de andrógenos.
- RIA : Radioinmuno análisis.
- StAR : Proteína esteroideogénica reguladora aguda.
- TMB : Tetrametil-bencidina.

RESUMEN

Los perros son una especie que genera problemas para la salud humana por su alta prolificidad. Para controlar la sobrepoblación canina se usa métodos como albergues, esterilización quirúrgica y esterilización química. Actualmente, el gluconato de zinc es uno de los más usados. El objetivo del presente estudio fue evaluar los parámetros de tamaño testicular, y niveles séricos de testosterona en 38 caninos machos aparentemente saludables, con edades entre 1 y 10 años, castrados con una inyección de Gluconato de Zinc en el distrito de San Jerónimo- Cusco. La evaluación se realizó a los cero, seis y doce meses post inyección. La dosis a inyectar se calculó para cada testículo. Se recolectaron muestras de sangre que fueron centrifugadas para la obtención de suero. Se realizó la medición de los niveles de testosterona usando la prueba de ELISA. Los valores observados se presentaron gráficamente con BOXPLOT y se verificó la normalidad usando la prueba Shapiro-Wilk. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de regresión múltiple. Para el testículo derecho, el tamaño testicular disminuyó significativamente entre el inicio, 6 meses y al año (19,9mm vs 17,5mm vs 14,5mm respectivamente, $p < 0.001$). Para el testículo izquierdo la disminución fue significativa, también (19.9mm vs 17,8mm vs 14,32mm, $p < 0.001$). Se observó una reducción final de 27% para el testículo derecho y de 28 % para el testículo izquierdo. Los niveles séricos de testosterona presentaron un promedio de 5,9ng/ml, 4,4ng/ml y 3,6ng/ml a los 0, 6 y 12 meses respectivamente, mostrando también una diferencia significativa. Con estos resultados concluimos que el producto es capaz de alterar la estructura testicular, generando infertilidad y una reducción en el tamaño testicular más no elimina la producción de testosterona por lo que las enfermedades relacionadas a esta hormona no podrían ser prevenidas mediante este método en su totalidad.

Palabras clave: Caninos, esterilización química, gluconato de zinc, tamaño testicular, testosterona

ABSTRACT

Dogs are a species that generates problems for human health because of their high prolificacy. To control the canine overpopulation various methods are used such as shelters, surgical sterilization and chemical sterilization. Currently, zinc gluconate is one of the most used. The aim of this study was to evaluate the parameters of testicular size, and serum testosterone levels in 38 apparently healthy male dogs, aged 1 to 10 years, castrated with an injection of Zinc Gluconate in the district of San Jeronimo Cusco. The evaluation was performed at zero, six and twelve months post injection. The injected dose was calculated for each testicle. Blood samples were collected and then were centrifuged to obtain serum. Measuring testosterone levels was performed using ELISA. Observed values are presented graphically with Boxplot and normality was verified using the Shapiro-Wilk test. The results were analyzed using multiple regression test. To the right testicle, testicular size decreased significantly between baseline, 6 months and one year (19,9mm vs 17,5mm vs 14,5mm respectively, $p < 0.001$). The left testis decreased significantly, too (19,9mm vs 17,8mm vs 14,32mm, $p < 0.001$). A final reduction of 27% for the right and 28% for the left testicle was observed. Serum testosterone levels had mean 5,9ng / ml, 4,4ng / ml and 3,6ng / ml at 0, 6 and 12 months respectively, also showing significant difference. With these results we conclude that the product is capable of altering the testicular structure, causing infertility and decreased testicular size but not eliminate testosterone production so diseases related to this hormone could not be prevented by this method in its entirety.

Keywords: Canine, chemical castration, Zinc gluconate, testicular size, testosterone

LISTA DE FIGURAS

Nº	TITULO	PAGINA
Figura 1.	Relaciones topográficas del pene y de otras estructuras pélvicas	6
Figura 2.	Representación esquemática de los órganos genitales del perro	6
Figura 3.	Estructuras de los testículos y escroto.	9
Figura 4.	Morfología interna del pene.	11
Figura 5.	Representación esquemática de la espermatogénesis en caninos	16
Figura 6.	Técnica de ELISA	22
Figura 7.	Técnica de castración abierta	24
Figura 8.	Vasectomía	27
Figura 9.	Aplicación intratesticular del Gluconato de Zinc	32
Figura 10.	Esquema de sitio adecuado para la inyección del gluconato de zinc	38
Figura 11.	Vernier para medición de tamaño testicular	39
Figura 12.	Boxplot de la variable de tamaño testicular derecho evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección.	43

Figura 13.	Boxplot de la variable de tamaño testicular izquierdo evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección.	45
Figura 14	Boxplot de la variable niveles séricos de testosterona evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección.	47

LISTA DE CUADROS

Nº	TITULO	PAGINA
Cuadro 1.	Cuadro resumen de estudios previo de la inyección intratesticular de gluconato de zinc	34
Cuadro 2.	Dosis correspondiente al ancho testicular	37
Cuadro 3.	Estadígrafos de la variable de tamaño testicular derecho evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección	44
Cuadro 4.	Estadígrafos de la variable de tamaño testicular izquierdo evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección	46
Cuadro 5.	Estadígrafos de la variable de niveles séricos de testosterona evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección	48

LISTA DE ANEXOS

N°	TITULO	PAGINA
Anexo 1.	Canine Testosterone Elisa Test Kit	65

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de los mamíferos existe una gran variedad de animales con gran capacidad prolífica considerando a los conejos, cerdos, gatos y perros algunas de ellas. Los perros poseen características reproductivas muy particulares. Un estudio realizado en el año 2010 estimó que existía más de 400 millones de perros en el mundo (lo que equivalía a la población conjunta de Estados Unidos, Canadá, Reino Unido y Francia), además un trabajo realizado en la ciudad de Mérida (México) muestra como éstos tienen la capacidad de reproducirse todo el año, con ciertas tendencias hacia finales de primavera e inicio del verano (Ortega *et al.*, 2000). En un período de 6 años una perra y sus crías, tienen la capacidad, a través de su descendencia, de producir 67,000 nuevos cachorros (Faulkner, 1975) y en 10 años la población canina puede crecer un 85% comparado con el 23.5% de crecimiento en la población humana (Schneider, 1975).

La sobrepoblación canina tiene un efecto directo en la salud humana ya que existen más de 65 enfermedades zoonóticas como la rabia, leptospirosis, anquilostomiasis, larva migrans, erliquiasis, brucelosis, cestodiasis, salmonelosis, entre otras, que los perros pueden transmitir (Faulkner, 1975). Dentro de la problemática, existe también un aumento en el número de casos de mordeduras por parte de perros callejero, habiéndose reportado en el Perú entre 50 mil a 60 mil ataques anuales siendo el grupo etáreo más afectado los niños de 1 a 4 años (57%) (Diario La República, 2010).

Con la finalidad de solucionar estos problemas, se han creado sociedades protectoras de animales que ofrecen servicio de recepción de animales no deseados, esterilización y animales en adopción. Sin embargo no posee la suficiente capacidad y respaldo económico para atender tantos animales, viéndose en la necesidad de sacrificarlos de forma masiva (Anónimo, 1976), por este motivo se han desarrollado diversos métodos quirúrgicos, dentro de ellos ovario histerectomía en hembras, la vasectomía y orquiectomía en machos los cuales requieren de anestesia, equipo capacitado y cuidados postoperatorios, resultando en muchos casos caros y poco prácticos (Galván *et al.*, 1994).

Ante la necesidad de un método práctico y de beneficio inmediato se ha planteado como opción la esterilización química. Hasta el día de hoy han sido probados una variedad de compuestos, algunos de los cuales son seguros, pero no todos efectivos o a la inversa (Fahim *et al.*, 1993; Immegart *et al.*, 2000). Estos compuestos son de aplicación intratesticular o en la cola del epidídimo, algunos de ellos: gluconato de clorhexidina, el etanol, la formalina, el cadmio y el gluconato de zinc (Galván *et al.*, 1994) han sido aplicados en diversas especies como cerdo, gatos y perros.

En los últimos años el gluconato de Zinc ha resultado ser uno de los más ampliamente utilizados. Si es inyectado en el conducto deferente o epidídimo, produce oclusiones fibrosas que bloquean el transporte de espermatozoides, dando como resultado la azoospermia (Bloomberg, 1996). A la inversa, cuando se inyecta en el parénquima testicular, causan atrofia testicular y la espermatogénesis disminuye con la reducción simultánea de las concentraciones de andrógenos, lo que puede reducir los trastornos andrógeno-dependientes, incluidas las enfermedades de la próstata, el comportamiento

indeseable (marcaje con orina, el montaje, la agresión), y enfermedad gonadal (Bloomberg, 1996). Estudios previos observaron azoospermia o necropermia 60 días post-inyección en 95% de los animales. Así, también, se demostró la disminución del tamaño testicular llegando aproximadamente a un 75 % del tamaño original a los 60 y 75 días pos inyección (Tepsumethanon *et al.*, 2005).

Desde 1981, investigadores demostraron que el zinc inhibe la biosíntesis de la testosterona en testículos de ratas, a través del complejo hormona-receptor (Oliveira *et al.*, 2007). Otro hallazgo encontrado fue que después de la inyección química, el libido se redujo en más del 50% (Soto *et al.*, 2007), a pesar de ello la variación hormonal y niveles de andrógenos no han sido muy estudiados usando este método de castración.

En ese sentido existe poca información en cuanto a los niveles séricos de testosterona post inyección de gluconato de zinc y su efecto en el tiempo sobre el comportamiento y trastornos andrógeno dependientes en el animal. Por lo tanto el presente trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto de la inyección intratesticular de gluconato de zinc sobre el tamaño testicular y niveles séricos de testosterona hasta un año después de la aplicación.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La sobrepoblación canina representa un problema grave en el mundo pero se agudiza más en los países subdesarrollados, donde la educación de respeto y convivencia con los animales es muy baja o prácticamente nula; esto se traduce en actividades crueles y un mayor índice de enfermedades transmisibles a los humanos.

Se considera que la descendencia de una sola perra puede llegar a ser de más de 60,000 cachorros en un periodo de 7 años. En la ciudad de México hay al menos tres millones de perros callejeros; aunado a ello, cada año esta cifra se incrementa en 20 por ciento (600 mil perros más). Para el año 2013 se estimo que la población de perros era de 700 millones siendo el 75% de esta, perros callejeros. El aumento de perros callejeros, o como lo ha denominado la Organización Panamericana de la Salud, perro de dueño irresponsable tiene un efecto directo en la salud humana ya que existen más de 65 enfermedades zoonóticas como la rabia, leptospirosis, anquilostomiasis, larva migrans, erliquiasis, brucelosis, cestodiasis, salmonelosis, entre otras, que los perros pueden transmitir (Faulkner, 1975). Si

se considera que los perros callejeros defecan aproximadamente 300 gramos al día y orinan medio litro de líquido, multiplicado por los 525 millones de caninos callejeros que hay en el mundo, se habla de toneladas de excremento que al secarse y dispersarse con los vientos ocasionan en los seres humanos enfermedades como las parasitosis.

Reportes en la dinámica de la población canina en municipalidades de Brasil han mostrado una gran proporción de caninos machos en relación con hembras, mostrando 6 o 7 machos por cada diez animales (Soto *et al*, 2001). Estudios realizados en la ciudad de Santiago de Chile nos muestran un promedio de perros por vivienda de 0,7628 con una relación hombre: perro de 6,4:1. La edad promedio de la población canina es de 3 años 7 meses (Ibarra *et al.*, 2003).

Así también podemos observar otro estudio realizado en la ciudad de Valdivia, Chile que nos muestra una relación hombre: perro de 6,6:1. El 44,9% de las viviendas poseían al menos un perro, con lo que se calcula una relación vivienda: perro de 1,5:1. La relación macho: hembra fue de 2,4:1, con predominio de los animales mestizos (79,3%) sobre los de raza. El rango de edad con mayor número de ejemplares fue de 1 a 4,9 años (48,9%), con una alzada mayoritariamente mediana (53,8%). El promedio de partos por hembra al año fue de 0,5, con un promedio de 5,1 crías por hembra al año (Guttler, 2005).

De todos los métodos para el control de la población canina de machos la orquiectomía es la más conocida y usada hasta el momento. Por ello hablaremos de la anatomía del aparato reproductor del macho, las técnicas de castración y la esterilización química.

2.1 ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

Los órganos genitales masculinos están compuestos por una serie de segmentos ubicados uno detrás de otro que tiene a su cargo la formación, la maduración, el transporte y transmisión de las células germinales masculinas, las células del semen (espermatozoides) (Konig, 2008). Este esfuerzo conjunto implica tanto al sistema neuroendocrino (hipotálamo y adenohipófisis) así como al genital (Cunningham, 2003) que está conformado por dos testículos cada uno suspendido dentro del escroto por un cordón

espermático y el músculo cremaster externo (Cunningham, 2003), epidídimos, conductos deferentes, glándulas accesorias y el pene (Feldman y Nelson, 2000) (Figura 1 y 2).

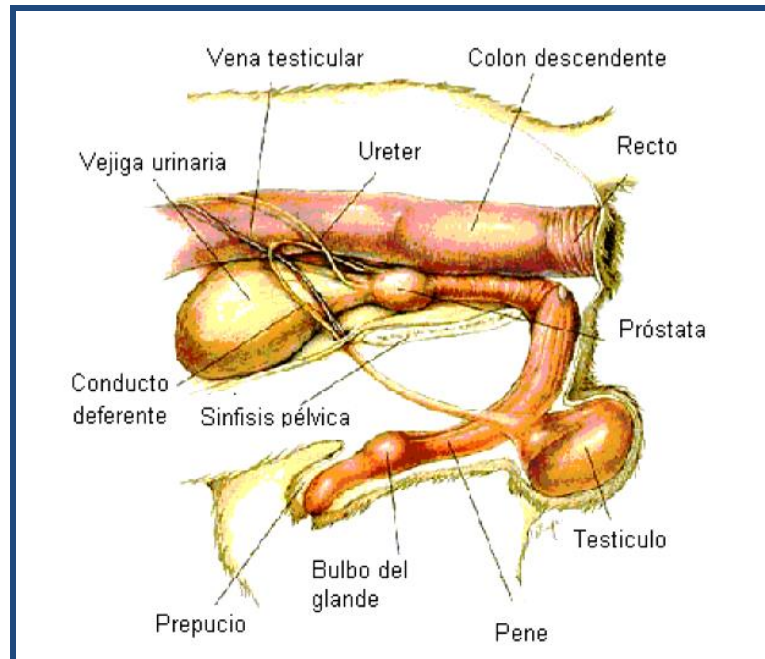
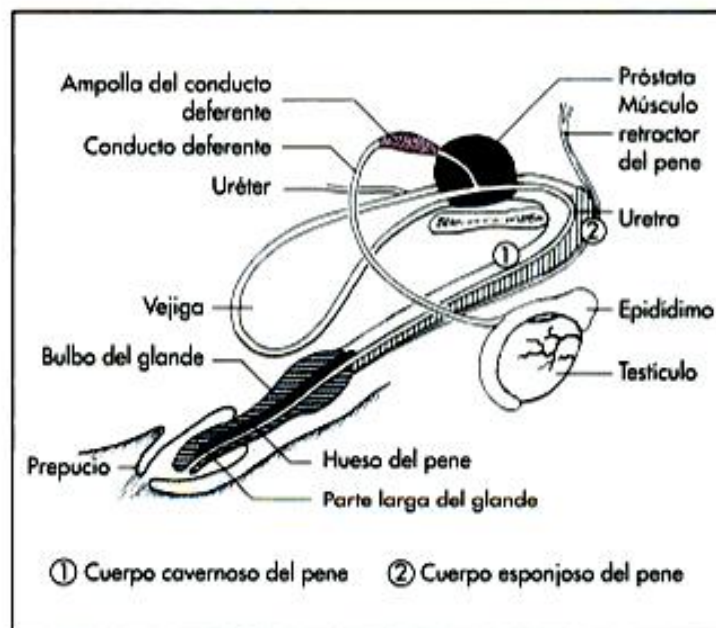


Figura 1. Relaciones topográficas del pene y de otras estructuras pélvicas



**Figura 2. Representación esquemática de los órganos genitales del perro
(Konig *et al.*, 2008)**

2.1.1 ESCROTO

Está situado cerca de la mitad que existe entre la región inguinal y el ano. El escroto del perro normal debe estar cubierto en forma escasa por vello, sentirse relativamente liso y suave, con una piel que se mueve con libertad sobre los testículos, sin dolor al tacto y con grosor uniforme (Feldman y Nelson, 2000). Además presenta una capa subcutánea de tejido fibroelástico denominada túnica de Dartos (Figura 3). La dartos divide al escroto en dos bolsas, y se adhiere a la túnica vaginal en el fondo de cada bolsa. (Bearden, 1982), al contraerse acerca la cubierta escrotal a su contenido testicular. Cada bolsa contiene al testículo ipsolateral, epidídimo, vasos deferentes distales y vasos sanguíneos asociados.

Dorso medialmente, dentro de cada cavidad, en el punto de unión y reflexión de la superficie serosa de recubrimiento, esta encajado un músculo, el cremáster, que se origina del borde caudal del músculo ipsolateral, oblicuo abdominal interno, desplazándose hacia abajo cerca del cordón espermático. Al contraerse, los cremáster elevan el escroto y a su contenido muy cerca de la pared abdominal. La naturaleza glandular, secretora de la piel delgada y sin pelo del escroto, aunada a la capacidad contráctil de los músculos dartos y cremáster, constituyen un mecanismo para la regulación de la temperatura testicular ya que la espermatogénesis no puede producirse con la temperatura normal del organismo en la mayoría de los mamíferos, por lo cual existen mecanismos que mantienen la temperatura testicular menor que la corporal (Allen, 1992).

2.1.2 TESTÍCULOS

El testículo (*griego: orchis, latín: testis y didymus*) es un órgano de localización bilateral, que al igual que el ovario, se desarrolla a ambos lados en la región lumbar, medial al riñón embrionario (mesonefros), a partir de la cresta gonadal. Desde esta situación intraabdominal, el testículo se desplaza hacia las bolsas escrotales (*Scrotum*) situadas en el

exterior de la cavidad abdominal. Mediante el desplazamiento de los testículos a las bolsas escrotales, se logra disminuir algunos grados la temperatura del órgano, lo cual es necesario para el correcto desarrollo de las células germinales masculinas (Konig, 2008). El izquierdo suele ser caudal con respecto al derecho.

El rango de tamaño de los testículos en perros se ha establecido entre 2 y 4 cm de longitud por 1.2 a 2.5cm de diámetro. Sin embargo, el que existan razas de tamaños tan variados impide una aseveración bien fundamentada acerca del tamaño normal de las gónadas (Feldman y Nelson, 2000).

El descenso de los testículos ocurre entre las dos y ocho semanas de edad (Kawakami *et al.*, 1991). La pubertad en el canino ocurre entre los nueve y doce meses de edad, siendo marcada por el apareamiento de los primeros espermatozoides en el eyaculado. Sin embargo, algunos caninos pueden ser fértiles a los 6 meses de edad (Christiansen, 1988). Con el inicio de la pubertad se activa el eje hipotálamo-hipofisis-gónadas y se induce la espermatogénesis por efecto de la FSH y la testosterona (Engelhardt y Breves, 2005).

El testículo es responsable de la esteroidogénesis, principalmente por la producción de andrógenos, así como la generación de células germinales haploides mediante la espermatogénesis. Estas dos funciones ocurren en las células de Leydig y en los túbulos seminíferos respectivamente (Cunningham, 2003).

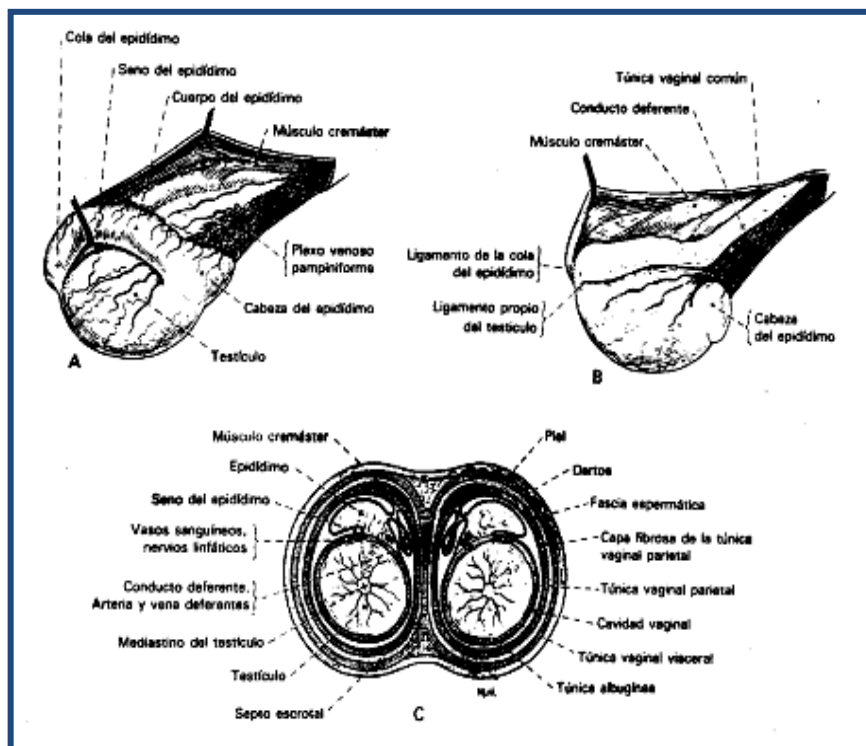


Figura 3: Estructuras de los testículos y escroto. A) Testículo derecho, cara lateral. B) Testículo izquierdo cara medial. C) Esquema del corte transversal del escroto y testículos

2.1.3 EPIDÍDIMO Y CORDÓN ESPERMÁTICO

El epidídimo está unido a la superficie dorsolateral del testículo, con la cabeza y cola situadas en los extremos craneal y caudal (Feldman y Nelson, 2000). El epidídimo es el que proporciona el ambiente necesario para llevarse a cabo la maduración final de los espermatozoides y sirve como órgano de almacenamiento para estas células (Getty, 1981; Johnston *et al.*, 2001). El epidídimo, el primer conducto externo que sale de los testículos, está unido longitudinalmente a la superficie de los testículos, y junto con éstos está encerrado en la túnica vaginal. Este túbulo convoluto único está cubierto por una extensión de la túnica albugínea del testículo. La cabeza del epidídimo es un área aplanada situada en la punta del testículo, donde los conductos eferentes (de 12 a 15 pequeños conductos) se

unen para salir como un solo tubo. El cuerpo del epidídimo se extiende a lo largo del eje longitudinal del testículo y se continúa con la cauda o cola. El lumen de la cola del epidídimo es más ancho que el cuerpo. La estructura del epidídimo y de otros conductos (conducto deferente y uretra) es similar a la porción tubular del sistema genital femenino. La túnica serosa capa externa va seguida de una capa muscular lisa (intermedia) y una capa epitelial (más interna) (Bearden, 1982).

Es en el epidídimo donde los espermatozoides maduran, se almacenan, y son transportados lentamente a través de él, para seguir a través de los conductos deferentes, que se extienden hasta la porción pelviana de la uretra para desaparecer por debajo de la próstata (Payro, 1981; Blank, 1994).

El epidídimo se continúa con el conducto deferente, localizado dentro del cordón espermático con origen en su cola, ubicada en posición medial y dorsal respecto a cada testículo conforme avanza a través del anillo inguinal interno. El cordón espermático se compone de conductos deferentes, arteria espermática, plexo de venas pampiniformes, vasos linfáticos, nervios y músculos cremáster (Feldman y Nelson, 2000). Además el cordón espermático está compuesto de fibras musculares lisas, tejido conectivo y una porción de conducto deferente. Tanto el cordón espermático como el escroto constituyen el sostén de los testículos.

2.1.4 PENE

Anatómicamente, el pene del perro es diferente al de las otras especies domésticas. Aún relajado, es un órgano relativamente rígido, firmemente anclado a la pared ventral abdominal del prepucio, el cual, excepto en la punta está adherido a lo largo de todo su borde dorsal (Evans, 1997). Es más o menos cilíndrico y se extiende desde el arco isquiático hasta cerca del ombligo en la pared abdominal ventral.

El pene está compuesto por tres partes principales: raíz, cuerpo y porción distal o glande, éste último está subdividido en el bulbo del glande y la porción larga del mismo. El

cuerpo de este órgano está rodeado por una gruesa cápsula fibrosa (túnica albugínea) que encierra numerosos espacios cavernosos (cuerpo cavernoso) así como el cuerpo esponjoso, que inmediatamente rodea la uretra (Cunningham, 2003). Además, existen cuatro pares de músculos extrínsecos del pene: retractores, isquiocavernosos, bulboesponjosos e isquiouretrales. El principal aporte sanguíneo proviene de tres ramificaciones de la arteria peneana continuación de la arteria pudenda interna. La mayor parte del pene está formado por el cuerpo cavernoso; este tejido erétil se origina por la convergencia de los dos pilares del pene, fijados al arco isquiático y cubiertos por el músculo isquiocavernoso. La porción distal se osifica formando el hueso del pene (*os penis*) (Payro, 1981) (Figura 4). Este hueso es ancho proximalmente y más estrecho distalmente y tiene un surco ventral donde se aloja la uretra.

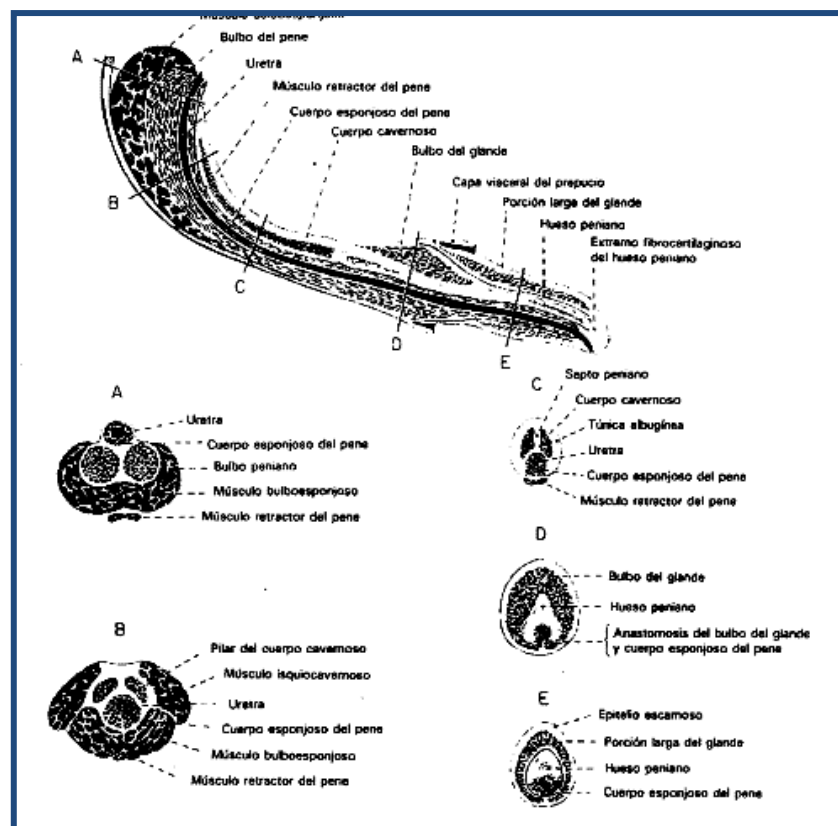


Figura 4: Morfología interna del pene. Dibujo superior: A) sección parasagital. Dibujo inferior: secciones transversales realizadas a cinco niveles indicados en las letras correspondientes en el dibujo superior.

2.1.5 PREPUCIO

Formada por una vaina completa alrededor de la parte craneal del pene, esta vaina tubular cubre aproximadamente, la mitad de la longitud del pene en estado de relajación, virtualmente la longitud completa del hueso peneano, incluyendo la pars longo del glande y la parte anterior de su bulbo, yacente dentro de su cavidad (Laing, 1988).

Consta de la capa más externa ordinariamente llamada integumento y las capas internas que son delgadas, de color rojizo y aglandulares. En estas capas hay también muchos nódulos que son especialmente grandes y a menudo prominentes en el fondo de la cavidad prepucial (Payro, 1981).

2.1.6 PRÓSTATA

Es la única glándula accesoria en el perro, produce el plasma seminal, la cual tiene la función de proteger y nutrir a los espermatozoides (Getty, 1981; Johnston *et al.*, 2001). En los perros menores de 4 años de edad, la próstata por lo usual se localiza en la cavidad pélvica en el margen del pubis. La próstata comienza a agrandarse en la pubertad, adquiriendo una localización intraabdominal (Fossum, 2008).

La glándula prostática rodea el cuello de la vejiga, la porción proximal de la uretra y la terminal del conducto deferente. Un tabique medio divide la glándula en dos lóbulos firmes, lisos y de igual tamaño, que suelen palpase a través del recto. El tamaño y peso de la próstata son variables y dependen de la edad, la raza y el peso corporal del perro.

2.2 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL CANINO MACHO

En los mamíferos el aparato reproductor del macho está regulado por intrincados sistemas de retroalimentación en los que participan el hipotálamo, el lóbulo anterior de la hipófisis y los testículos (Cunningham, 2003).

El proceso fisiológico de producir espermatozoides está muy relacionado con la producción de hormonas esteroideas, los andrógenos y el estradiol, pero se realizan cada uno en diferentes áreas de los testículos. La espermatogénesis tiene lugar en los compartimientos localizados dentro de los túbulos seminíferos a través de las células de Sertoli, en ellas se encuentra en la parte basal células germinales en etapa de espermatogonias en división mitótica, mientras que en la sección adluminal de los túbulos contiene espermatoцитos primarios en división meiótica que darán lugar a espermatoцитos secundarios y espermátidas.

La síntesis de hormonas esteroideas se produce en el comportamiento de tejido intersticial formados por células de Leydig en el testículo. Estas células, influenciadas por la acción de la LH, producen entre otras hormonas a la testosterona, hormona esencial para el desarrollo de características sexuales secundarias, comportamiento normal, función de las glándulas accesorias y la producción de espermatozoides.

Hay dos sistemas hormonales en el aparato reproductor del macho, uno que implica testosterona GnRH- hipofisiaria LH-testicular y el otro que implica inhibina GnRH-hipofisiaria y FSH testicular. La producción de espermatozoides maduros requiere de la presencia de FSH y andrógenos masculinos, sobre todo la testosterona, dentro de los testículos. La secreción endógena de testosterona por parte de las células intersticiales (de Leydig) baña los túbulos seminíferos y promueve la espermatogénesis. También se requiere testosterona para mantener las actividades de secreción y absorción de los conductos eferentes, el epidídimo y el conducto deferente; para el crecimiento y mantenimiento de la próstata y para mantener la libido (Laing, 1988).

La GnRH estimula la secreción de LH, que a su vez impulsa la secreción de testosterona. La GnRH se secreta en el sistema portal hipofisiario en periodos bien

definidos. En consecuencia, la secreción de LH y testosterona es pulsátil y su concentración sérica fluctúa. La testosterona, tal vez junto con el estradiol, inhibe la secreción de GnRH y LH. El estradiol se secreta por los testículos o se produce a través de aromatización local de testosterona (Feldman, 2000; Laing, 1988).

La FSH estimula la espermatogénesis indirectamente al actuar sobre las células de Sertoli. Se requiere de FSH para mantener la diferenciación de células germinativas y el desarrollo de espermatozoides. La FSH también facilita la conclusión de la maduración de espermátides por estimulación del desarrollo de células de Sertoli, la función de éstas y la síntesis de la proteína de unión a andrógenos. La secreción de FSH es estimulada por GnRh e inhibida por inhibina, una glucoproteína no esteroide secretada por las células de Sertoli (Feldman, 2000).

Dentro del testículo, la LH se une a los receptores de membrana de las células de Leydig y estimula en ellos la conversión del colesterol en testosterona. En perros adultos las concentraciones de testosterona en plasma varían entre 0,5 y 10,0 ng/ml (Allen y England, 1993; Feldman y Nelson, 1996), existiendo una gran variación durante el día en un perro individual. En perros castrados los valores son siempre inferiores a 0,2 ng/ml (Matamoros *et al.*, 2002).

Una vez sintetizados, los andrógenos se difunden a sangre y a linfa, donde se unen a las proteínas transportadoras de andrógenos, que se producen en las células de Sertoli. Altas concentraciones de andrógenos dentro del testículo se consideran esenciales para que la espermatogénesis pueda darse con normalidad.

La espermatogénesis (Figura 5), desencadenada en los túbulos seminíferos (Foote *et al.*, 1972), se divide en tres procesos principales:

2.2.1 ESPERMATOCITOGENÉISIS, en la cual las espermatogonias experimentan una división mitótica, una parte de estas espermatogonias se conserva como población germinal, mientras que otra parte se siguen diferenciando en espermatoцитos primarios hasta iniciar una meiosis. Los espermatoцитos primarios son las células germinales mayores del epitelio germinal, sin embargo todavía son diploides es decir, en

total poseen cuatro juegos de ADN (ADN 4n), durante la primera división meiótica se forman espermatoцитos secundarios haploides (ADN 2n), estos entran inmediatamente en la segunda división meiótica en la que cada una de las espermátidas obtenidas solamente contiene una copia de todo el juego cromosómico (ADN 1n), por lo tanto, en la meiosis, a partir de un espermatoцитo primario diploide se obtienen cuatro espermátidas haploides.

2.2.2 ESPERMIOGÉNESIS, es el proceso mediante el cual las espermátidas se diferencian en espermatozoides altamente especializados (Engelhardt y Breves, 2005). Básicamente el núcleo pasa a formar la cabeza del espermatozoide, el aparato de Golgi forma el acrosoma, y las mitocondrias y centriolos intervienen en el desarrollo de la cola. La mayor parte de citoplasma queda en las células de Sertoli que aparecen sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos; regulan la metamorfosis de espermátida a espermatozoide.

2.2.3 ESPERMIACIÓN, proceso en el cual las espermátidas se liberan a la superficie luminal de los túbulos seminíferos como espermatozoides (Cunningham, 2003).

La espermatogénesis comienza a los 4 meses de edad, aunque los espermatozoides no aparecen en el eyaculado hasta los 10 a 32 meses de edad (Allen, 1992) y tiene una duración de 8 a 9 semanas, pudiendo ser observados 4,5 ciclos epiteliales en los túbulos seminíferos. La duración del ciclo del epitelio seminífero en los caninos es de 13,8 días en promedio, siendo divididos en 8 fases o estadios. El tránsito de los espermatozoides a lo largo del epidídimo es de 14 días en promedio (Foote *et al.*, 1972).

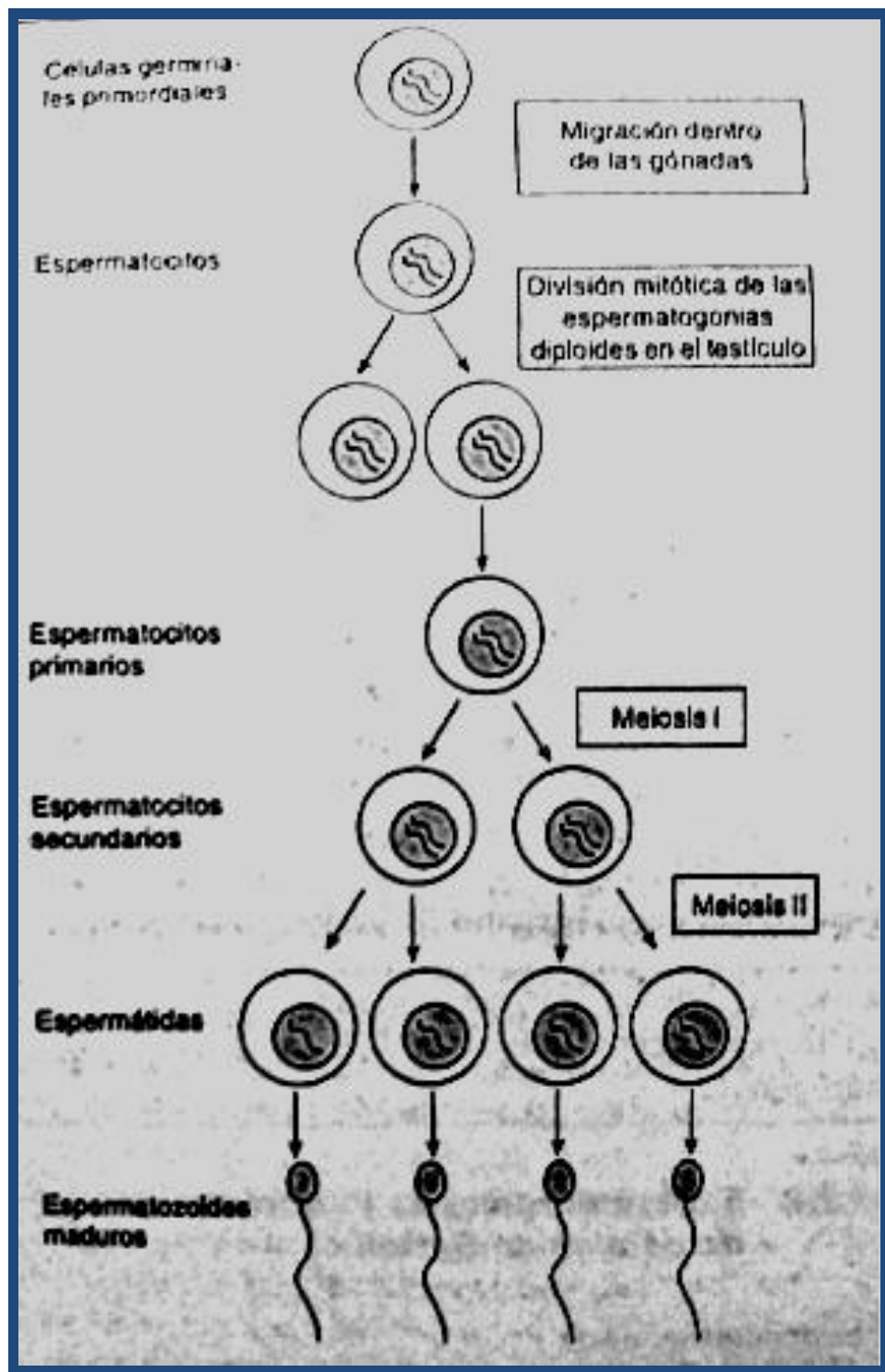


Figura 5. Representación esquemática de la espermatogénesis en caninos (Engelhardt y Breves, 2005).

2.3 TESTOSTERONA BIOSÍNTESIS TRANSPORTE Y METABOLISMO

La testosterona es una hormona esteroidea formada del colesterol captado de la sangre en forma de lipoproteínas de baja densidad (Setchell, 1977; Illera1994) por endocitosis y liberado al citosol por degradación lisosómica (Ilera, 1994). La principal fuente de testosterona desde la pubertad hasta la adultez es el testículo (95%) y el 5% restante corresponde a la secreción adrenal (Losno *et al*, 1977).

El colesterol luego de ser captado es transferido dentro de la mitocondria, facilitado por la proteína esteroideogénica reguladora aguda (StAR) (Hales *et al.*, 2005), donde es convertido a pregnenolona por el sistema enzimático fragmentador de la cadena lateral. Luego la pregnenolona es transportada al retículo endoplásmico liso, en donde puede seguir dos vías enzimáticas de síntesis: por una vía la pregnenolona es convertida a progesterona por la 3-hidroxi-esteroide deshidrogenasa/isómera, ésta a 17-hidroxiprogesterona por la 17-hidroxilasa, esta a androstenediona por la C₁₇-C₂₀ liasa y por último a testosterona por la hidroesteroide deshidrogenasa; en la segunda vía la pregnenolona es convertida en 17-hidroxipregnenolona por la 17-hidroxilasa, esta a dehidroepiandosterona por una liasa, esta a androstenediona y por la 3-hidroxiesteroide isomerasa y esta a testosterona por la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Dependiendo de la especie, existe una mayor o menor preferencia por una u otra vía de síntesis, y pueden existir cruces o intersecciones en ambas vías a distintos niveles (Ilera, 1994).

La testosterona es secretada por difusión y es transportada a la sangre, linfa y lumen tubular (García, 1995). Al cuerpo es llevado principalmente a través de la sangre (Setchell, 1970). La alta concentración intratesticular (50 a 100 veces mayor que la concentración del suero sanguíneo) (Chastain y Ganjam, 1986), resulta de la transferencia de la testosterona de la sangre venosa testicular a la arteria testicular por el plexo pampiniforme (Mc Donald, 1991), y directamente por la proteína ABP desde los espacios intercelulares al lumen tubular (Lubos, 1987).

En la sangre, la testosterona es distribuida o transportada uniéndose a proteínas captadas extracelularmente, como puede ser por una alfa globina de unión para esteroides

(Chastain y Ganjam, 1986; Hafez, 2002) y/o por la albúmina sérica que mediante una unión débil y reversible transporta a la testosterona por un tiempo de 15 a 30 minutos antes que se fije a los tejidos (García, 1995). Aproximadamente el 98% de la testosterona está unida y la restante se encuentra libre para entrar a la célula blanca, en donde puede ser convertida a dihidrotestosterona por la 5-reductasa o a 17-estradiol por aromatización (Chastain y Ganjam, 1986 ; Hafez, 2002).

La testosterona no es almacenada en el organismo, bien se la consume o se la degrada y excreta en formas inactivas (Moore, 1969). La testosterona es primariamente metabolizada en el hígado, en el cual por oxidación se transforma en androstenediona la cual se transforma en androsterona, epiandrosterona y androsterona excretándose al intestino con la bilis o eliminándose con las heces, y al conjugarse estos metabolitos con el ácido glucorónico o ácido sulfúrico, se excretan en la orina bajo la forma de sales solubles en agua (Moore, 1969; García, 1995). Sin embargo, el catabolismo de los andrógenos también ocurre en los riñones, corteza adrenal, testículos y otros tejidos (Hooker, 1965; Baird, 1972; Ilera, 1994).

2.3.1. UTILIDAD CLINICA

Las medidas de la testosterona son útiles en la evaluación de estados hipogonadales (Romagnoli, 1991; Knol *et al.*, 1993). Entre las causas comunes de descenso de testosterona en machos se incluyen: el hipogonadismo, la orquiectomía, terapia con estrógenos, el síndrome de Klinefelter, el hipopituitarismo, la feminización testicular y cirrosis hepática.

2.3.2. MÉTODOS ACTUALES PARA DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA

Existen numerosos métodos asequibles para la cuantificación de testosterona en suero. Las técnicas utilizadas para estimar la concentración de testosterona en suero/plasma se dividen en siete categorías principales:

1. Cromatografía de gases/espectroscopía de masas (Sabot, *et al.*, 1985).
2. Espectrometría de masas por dilución de isótopos
3. Cromatografía en capa fina (Vingler,*et al.*,1991).
4. Quimioluminiscencia
5. Cromatografía de líquidos de alta resolución (Ueshiba *et al.*, 1991).
6. Inmunoanálisis ligados a enzima
7. Radioinmunoanálisis

El desarrollo desde los años 60 de radioinmunoanálisis extremadamente sensibles y específicos (RIA) revolucionó la cuantificación de los esteroides. Debido a su velocidad, simplicidad y relativamente bajo costo era un método bastante utilizado. Esta tendencia fue reforzada por la disponibilidad de equipo reactivos comerciales fiables y convenientes (Soto *et al*, 2001). En los RIA, se hace reaccionar una cantidad limitada de un anticuerpo específico con la hormona. La testosterona marcada con I125 compete durante un tiempo fijo con la testosterona en una muestra del paciente. Tras la separación de la hormona libre de la unida, se cuantifica la cantidad de radiactividad de la fracción unida y se utiliza para construir una curva patrón frente a la cual se miden las muestras desconocidas (Chen *et al.*, 2002; Leyva *et al*, 1993).

El radioinmunoensayo desarrollado en 1959 por Yalow y Berson, es el precursor de los ensayos inmunoenzimáticos que fueron descritos originalmente en 1971 por Engvall y Perlmann, y Van Wemen y Schuurs, sin embargo tenían ciertas desventajas como el uso de protección radiológica, eliminar desechos radiactivos que contaminan el medio ambiente y que los reactivos marcados usados tienen vidas medias cortas, todo esto popularizó el empleo del inmunoensayo enzimático (EIA), del que hay dos técnicas principales: el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y el ensayo inmunológico multiplicado por enzimas (EMIT) (Guzmán, 2004; Raichle, 1994).

Fueron Eva Engwall y Peter Perlmann quienes le dan el nombre de Enzyme Linked Immunosorbent assay que luego sería abreviado como ELISA (Guzmán, 2004). El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza como sus siglas lo indican una enzima

como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo (Sino Biological Inc, 2004).

Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular (>30 000 daltons), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpos específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. Casi todas las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido (Crowther, 2009; Guzmán, 2004). Algunos de los protocolos se basan en reacciones de enlace competitivo y otras en reacciones de enlace no competitivo, pero en todas las pruebas ELISA se requiere de un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Para lo cual se añade sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato. Por sus características catalíticas las enzimas son marcadores muy sensibles y versátiles. Una sola proteína enzimática puede transformar en algunos minutos gran número de moléculas de sustrato en una cantidad igualmente abundante de producto final, produciendo un cambio de color amplificado y que se detecta con facilidad (Guzmán, 2004).

La prueba ELISA se basa en varias teorías: 1)El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica; 2)las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando; 3) la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento; y 4) las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar (Guzmán , 2004; Chiaroni, 1998).

Los anticuerpos utilizados en el método ELISA son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada, pueden ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido, son empleados como conjugados no marcados o enzimáticos y por ultimo reaccionan con

determinante antigénico específico de un antígeno o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario) según el protocolo de análisis. Por otro lado, los antígenos se purifican o se producen con tecnología recombinante, y al igual que los anticuerpos se utilizan como conjugados marcados o enzimáticos y son inmóviles o solubles, dependiendo del protocolo de análisis (Guzmán, 2004).

La prueba cuantitativa de testosterona se basa en un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el método de unión competitiva. Una muestra (suero / plasma / orina) que contiene una cantidad desconocida de testosterona (antígeno sin marcar) se añade a una cantidad estándar de un conjugado de testosterona (antígeno marcado). Los antígenos marcados y no marcados se dejan para competir por los sitios de unión de alta afinidad de los anticuerpos anti-testosterona ubicados sobre la placa. La reacción se lleva a cabo tras incubar durante 1 hora a 37 ° C, en este período se lleva a cabo una reacción bio-específica luego se procede a lavar el antígeno libre y agregar la solución de sustrato TMB y se incuba durante 20 minutos, para luego detener la reacción con una solución de parada (HCl 2 N). Se procede a medir las absorbancias utilizando un lector de placas ELISA. La cantidad de antígeno marcado en la muestra es reversiblemente proporcional a la concentración del antígeno sin marcar (Endocrine Technologies, Inc.; Sino Biological Inc., 2004). A medida que la concentración aumenta en la muestra la intensidad del color disminuye proporcionalmente (Figura 6).



Figura 6. Técnica de ELISA: 1) Presentación del Kit, 2) placa y aditivos para la prueba; 3) Lavado; 4) Lectura de absorbancias y obtención de resultados.

2.4 TECNICAS DE ESTERILIZACIÓN EN MACHOS

Los perros presentan características reproductivas muy particulares, siendo a su vez muy prolíficos. Se estima que existen más de 400 millones de perros en el mundo. Los problemas que ello conllevan sobre la salud humana son el riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas, un aumento de casos de mordeduras por parte de perros callejeros, así como la contaminación de las calles con heces de estos animales (Ortega *et al.*, 2000). Para la solución de esta problemática existen medios como la creación de

sociedades protectoras, la adopción, la esterilización por medios quirúrgicos , los que requieren personal capacitado y son de mayor costo y poco prácticos con un sin número de posibles complicaciones, y la esterilización química; métodos de los cuales hablaremos a continuación (Anónimo, 1976, Galván *et al.*, 1994).

La castración se realiza con frecuencia para anular sexualmente o para modificar o eliminar patrones de conducta característicos de machos, el vagabundeo y el comportamiento miccional indeseable (Fossum, 1999). La neoplasia, traumatismos graves y la orquitis/epididimitis refractarias son indicaciones médicas primarias para realizar la orquiectomía. Este procedimiento elimina las fuentes endógenas de hormonas androgénicas que pueden ser las mediadoras de una hipertrofia prostática benigna, adenoma perianal y hernia perianal (Bojrab, 1993).

A continuación se describen las diversas técnicas de castración en caninos machos:

2.4.1 ORQUIECTOMÍA

Este procedimiento se realiza bajo anestesia general. Puede emplearse el acceso preescrotal o perineal. El abordaje preescrotal es más común y con menor dificultades. Los testículos son más difíciles de exteriorizar con el acceso perineal (Fossum, 1999).

2.4.1.1 CASTRACIÓN PREESCROTAL ABIERTA: este método es recomendado en perros de más de 20 kg de peso (Bojrab, 1993). Colocar al paciente decúbito dorsal. Verificar la presencia de ambos testículos en el escroto. Rasurar y prepara en forma aséptica el abdomen caudal y medial de los muslos. Evitar la irritación escrotal con la rasuradora o los antisépticos. Colocar los paños de campo, aplicar presión sobre el escroto para avanzar un testículo lo más lejos posible dentro del área preescrotal (Fossum, 1999). Se incide la piel y el tejido subcutáneo en la línea media ventral del prepucio y se continúa la incisión a través de la fascia espermática para exteriorizar el testículo. Se expone el testículo cubierto por su túnica vaginal. Colocar una hemostática a través de la túnica vaginal donde se une con el epidídimo. Separa digitalmente el ligamento de la cola del epidídimo desde la túnica mientras se aplica tracción con la hemostática sobre la túnica. Exteriorizar adicionalmente el testículo mediante la aplicación de tracción caudal y hacia

afuera. Identificar las estructuras del cordón espermático. Ligar en forma individual los cordones vasculares y conducto deferente, luego incluirlos en una ligadura que los encierre con material de absorción lenta y se seccionan (Fossum, 1999; Bojrab, 1993) (Figura 7). Las ventajas del método abierto son las ligaduras vasculares que se hacen en forma directa y son más seguras. Las desventajas son el abordaje a una parte extensa de la cavidad peritoneal y un mayor tiempo quirúrgico. Inspeccionar el cordón espermático por hemorragia y recolocar dentro de la túnica.

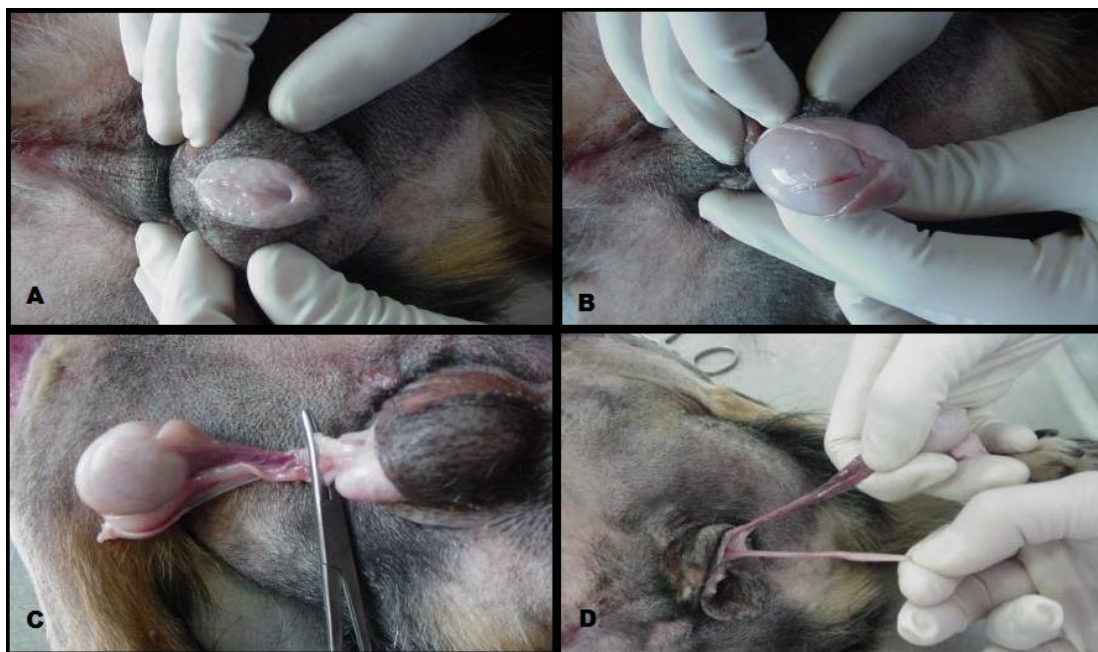


Figura 7. Técnica de castración abierta: A. Incisión cutánea; B. Exteriorización del testículo. Apertura de túnica vaginal parietal.; C. Se muestra testículo y cordón espermático; D. Se aísla el conducto deferente.

2.4.1.2 CASTRACIÓN PREESCROTAL CERRADA: esta técnica se utiliza en pacientes de menos de 20 kg. Cerrada significa que el contenido del cordón espermático será pinzado en tres puntos, ligado y seccionado con el proceso vaginal intacto a su alrededor. Exteriorizar al máximo el cordón espermático reflejando la grasa y fascia desde la túnica parietal con una torunda. Aplicar tracción sobre el testículo mientras se desgarran las inserciones fibrosas entre la túnica del cordón espermático y escroto. Colocar ligaduras en masa alrededor del cordón espermático y tunicas. Pasar la aguja a través del músculo

cremaster si se desea una ligadura de transfixión. Al colocar esta ligadura se debe tener cuidado de no atravesar el paquete vascular del cordón.

Después de seccionar el cordón espermático, ya sea mediante la técnica abierta o cerrada, la porción remanente se reintroduce dentro del tejido subcutáneo bajo control directo de la pinza. Es importante controlar el cordón durante este paso porque los vasos se acortan y dilatan a medida que se libera la tensión y puede además zafarse alguna de las ligaduras. Si se presenta un foco hemorrágico, el cordón o los vasos pueden ser inmediatamente expuestos para un control más adecuado si se los sujeta con la pinza. Después de inspeccionar toda el área se realiza la síntesis subcutánea profunda y superficial y la subdermis cutánea, utilizando material absorbible y puntos simples con los nudos escondidos o con un patrón continuo. Afrontar el tegumento con patrón de sutura intradérmica, subcuticular o interrumpida simple (Fossum, 1999; Bojrab, 1993).

2.4.1.3 CASTRACIÓN PERINEAL. La castración perineal se realiza utilizando las mismas técnicas que para la castración preescrotal abierta. Es más difícil desplazar los testículos hacia una incisión caudal que a otra preescrotal. Debe usarse una técnica abierta., para ello se realiza una incisión en la piel y el tejido subcutáneo de la línea media en dorsal del escroto a nivel perineal por debajo del ano. Luego de eso avanzar el testículo hacia la incisión y seccionar la fascia y túnica espermáticas. Exteriorizar el testículo y ligar el cordón espermático como se describiera para la castración preescrotal abierta (Fossum, 1999).

2.4.2 VASECTOMÍA

La vasectomía inhibe la fertilidad masculina mientras mantiene los patrones conductuales del macho. Los andrógenos continúan elaborándose porque las células de Leydig no se alteran de modo significativo. La técnica rara vez se recomienda porque el vagabundeo, agresividad y marcación urinaria persisten mientras que no ocurre una reducción de las enfermedades con mediación hormonal. Los espermatozoides persisten en el eyaculado canino durante tres semanas (Pineda, Dooley, 1984).

Para esta intervención quirúrgica se requiere de un rasurado meticuloso del escroto y región adyacente, así como la aplicación de productos antisépticos para preparar adecuadamente el campo quirúrgico. Es necesaria la anestesia general del paciente. Aunque están descritas varias formas de abordar los conductos deferentes quizás la más cómoda sea hacer una incisión independiente para cada uno de los dos, en la parte craneolateral del escroto.

Efectuar una incisión de 1 a 2cm sobre el cordón espermático entre el escroto y el anillo inguinal (Figura 8).

Localizar el cordón espermático, incidir la túnica vaginal y aislar el conducto deferente mediante disección roma. Hacer doble ligadura del conducto deferente y reseca una sección de 0,5cm del mismo entre las ligaduras. Repetir el procedimiento sobre el cordón espermático contralateral. Afrontar los tejidos subcutáneos y el tegumento.

Dado que en esta técnica no se extirpa una porción del conducto deferente, sino que sólo se secciona, existe la posibilidad remota de que se produzca una recanalización del mismo, volviendo a ser fértil el paciente.

Por otra parte, puesto que en la parte final del conducto deferente quedan espermatozoides, existe un periodo de tiempo después de la vasectomía en que el paciente sigue siendo fértil, hasta que estos espermatozoides envejecen. Por ello, deberá evitarse el apareamiento durante este período.

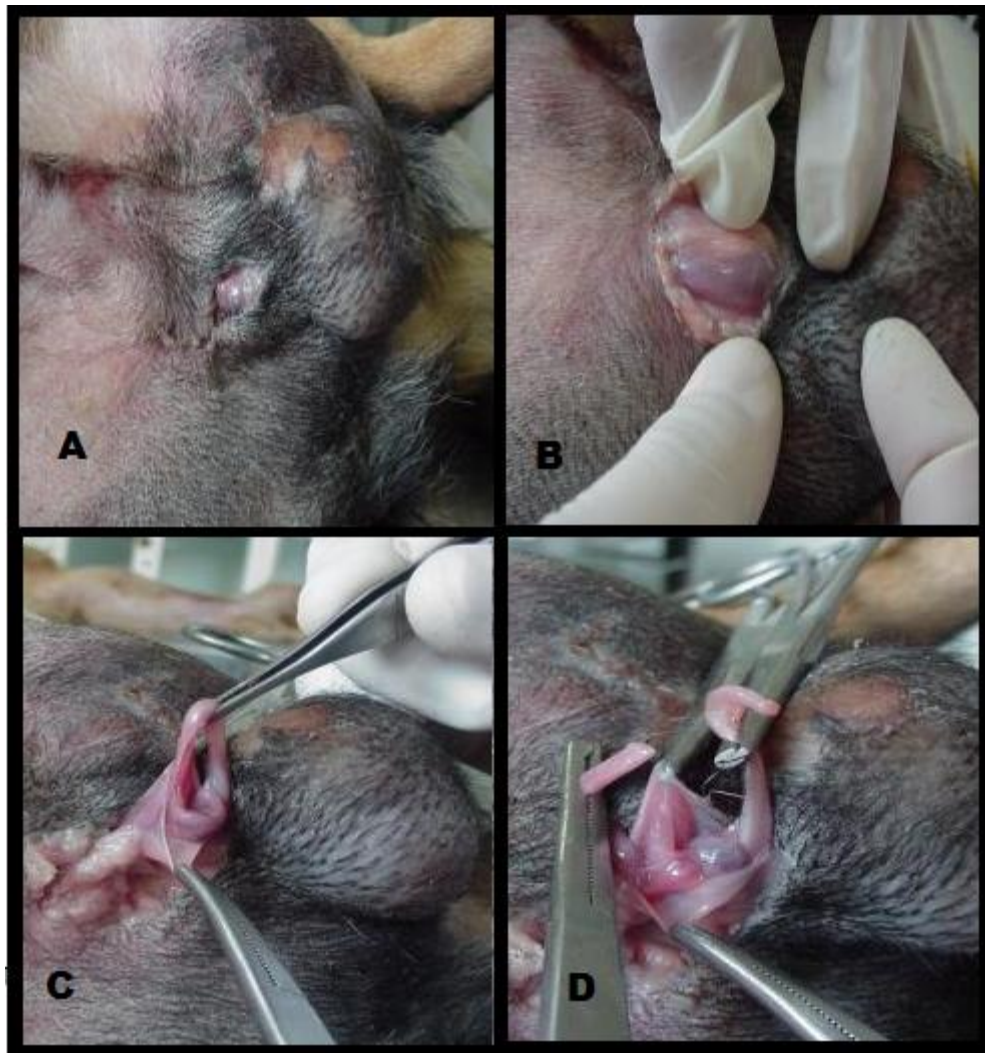


Figura 8. Vasectomía: A. Incisión cutánea; B. Cordón espermático; C. Se aísla el conducto deferente del cordón espermático, D. Se secciona el conducto deferente y se ligan los extremos.

2.4.3 CASTRACIÓN QUÍMICA

Investigaciones para buscar agentes anticonceptivos en caninos machos se iniciaron solo en las últimas décadas (Joechle, 2004). La esterilización química se presenta como una solución para la sobrepoblación canina y para los métodos no quirúrgicos de anticonceptivos en machos (Concannon, 1991; Fayrer *et al.*, 2000). Una variedad de compuestos han sido probados, alguno de los cuales fueron seguros pero no efectivos y viceversa (Fahim *et al.*, 1993; Immegart, 2000).

Los medicamentos y vacunas anticonceptivas funcionan por un efecto farmacológico específico o promoviendo una respuesta inmunológica que inhiba o promueva el bloqueo de algún componente del sistema reproductivo animal, derivando en infertilidad (Aitziber, 2005).

El producto ideal debe cumplir los parámetros siguientes (Aitziber, 2005):

- Inducir una infertilidad permanente.
- Ofrecer resultados rápidos.
- Eliminar el comportamiento sexual.
- Tener los mismos beneficios para la salud de los pacientes de los que se obtienen con los procedimientos quirúrgicos.
- Obtener lo anterior con una sola dosis.
- Preferiblemente servir para ambos sexos.

Algunos de las sustancias probadas fueron:

PROGESTÁGENOS

Los progestágenos como el megestrol (acetato) y la medroxiprogesterona reducen la calidad seminal (disminución de número total de espermatozoides, motilidad espermática y número de espermatozoides morfológicamente normales), garantizando una función anticonceptiva. Los efectos secundarios observados incluyen el desarrollo de la diabetes mellitus y tumores mamarios lo que limita su uso en perros.

ANÁLOGOS DE LA GnRH

Los análogos de la GnRH actúan sobre la supresión del eje pituitario-gonadal y conducen a una disminución de la testosterona y LH y azoospermia (Inaba *et al.*, 1996). Ambos progestágenos como análogos de GnRH son anticonceptivos temporales y el animal tiene su actividad reproductiva se reanudó después de discontinuar el uso de ellos.

Análogos de la GnRH como deslorelina (Suprelorin, Peptech Animal Health, Australia) se han utilizado experimentalmente en perros en forma de implantes, la región escapular aplicado en una dosis de 0,39mg / kg de ingrediente activo (Trigg *et al.*, 2001; Junaidi *et al.*, 2003).

En los gatos, el uso de Deslorelin es más reciente (Romagnoli *et al.*, 2010). El efecto del análogo, cuya eficacia anticonceptiva llega a ser del 98% (Trigg, 2004) contribuye a reducir la producción de testosterona, que cae por debajo de las tasas de 1 ng / ml. Hasta la fecha no hay un efecto adverso resultante de la aplicación de los implantes, que tienen un periodo de acción estimado entre 8 y 12 meses.

El Azaglinafarelina (Gonazón-CR / Intervet) es una droga similar a la nafarelina. También se utiliza como un implante subcutáneo, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, es un medicamento seguro que se puede aplicar prepúberes hembras y machos adultos. La anticoncepción se extiende por un período de hasta un año después de la administración del implante y no parece interferir con el desarrollo corporal de los animales sometidos a tratamiento (Concannon, 2005). Aunque se observan diferencias en la intensidad del efecto de retroalimentación negativa entre las especies análogos de la GnRH han demostrado ser eficaces como anticonceptivos en caninos y felinos salvajes (Bertschinger *et al.*, 2002).

AGENTES ESCLEROSANTES

Hay informes en la literatura sobre el uso de agentes esclerosantes en los testículos, el epidídimo y los conductos deferentes (Pineda *et al.*, 1977;. Nishimura *et al.*, 1992;. Immegart y Threlfall, 2000).

Si los agentes son inyectados en el conducto deferente o el epidídimo se induce una fibrosis que bloquea el transporte de los espermatozoides, resultando en una azoospermia, sin embargo los trastornos andrógenos dependientes no deben ser ignorados (Bloomberg, 1996). Contrariamente, cuando dichos agentes son inyectados intratesticularmente estos causan atrofia testicular y una disminución de la espermatogénesis con una reducción notable en la concentración de andrógenos, esto podría disminuir los desórdenes andrógenos dependientes incluidos las enfermedades prostáticas, comportamiento indeseable (marcaje por orina, monta y agresión) y enfermedades gonadales (Bloomberg, 1996).

Hasta el momento ningún producto satisface todas estas exigencias. Los primeros esfuerzos para encontrar químicos que causarán fibrosis en el testículo iniciaron con los criadores de cerdos cuyo objetivo principal era reducir el mal sabor en la carne de verracos adultos debido a la acción de hormonas andrógenas (FAWEC, 2013).

Para ello fueron probados nitrato de plata, formalina, etanol al 95% y quinacrina (Fahim *et al.*, 1993; Pineda *et al.*, 1977). En el caso de caninos existen una variedad de compuestos para dicho propósito que han sido probados, siendo los más relevantes el digluconato de clorhexidina al 3%, etanol, la formalina, cadmio, metilcianoacrilato, cloruro de calcio y gluconato de zinc (Herath *et al.*, 2004; Cedillo *et al.*, 2006).

Así tenemos que el metilcianocrilato fue probado en 15 perros mediante la inyección en la cola del epidídimo, observando azoospermia en 9 (60%) a los 15 días de aplicado el producto y en 13 (86,7%) a los 30 días. Un solo animal presento espermatozoides en el eyaculado a los 180 días con una alta proporción de muertos (40%) y anormales (60%). Al examen histológico se pudo observar fibrosis intersticial difusa con infiltración de células mononucleares y necrosis delimitada a la zona de aplicación.

Por otro lado el cloruro de calcio fue probado en 21 caninos machos que recibieron una inyección intratesticular mostrando una disminución del tamaño testicular, azoospermia hasta 12 meses post inyección, disminución en niveles de testosterona y desaparición del libido. Cabe mencionar que los niveles de testosterona regresaron a la

normalidad al año de estudio. Otro estudio realizado en 30 animales evaluó la inyección intratesticular de cloruro de calcio a diferentes dosis por kilogramo mostrando una mayor reducción de tamaño testicular cuanto mayor fue la dosis aplicada. Bajo la histopatología se observaron cambios degenerativos en el parénquima testicular, pérdida de células germinales, atrofia de túbulos seminíferos. Hubo también una marcada disminución de la concentración espermática y disminución en los niveles séricos de testosterona siendo esta mayor en los perros que recibieron una mayor dosificación.

A continuación hablaremos del gluconato de zinc su uso, beneficios y estudios previos.

2.4.3.1 GLUCONATO DE ZINC

La inyección intratesticular e intraepididimal de gluconato de zinc con arginina ha demostrado mayor promesa que otros esterilizantes químicos. Esta conduce a la atrofia testicular, con una alta incidencia de esterilidad, las inyecciones intraepididimales también conducen a la esterilidad causando solamente reacciones inflamatorias leves. Aunque la eficacia puede ser más alta que otros métodos, esta técnica todavía no se ha logrado usar en forma rutinaria (Wang, 2004).

El zinc es considerado no carcinogénico, no teratogénico, y no mutagénico (Leonard *et al.*, 1987). Es esencial para el crecimiento, reproducción y tiene efectos beneficiosos en el proceso de reparación tisular y curación de heridas. Este elemento es un componente esencial de un sin número de enzimas presentes en el tejido animal, incluido la deshidrogenasa, fosfatasas, anhidrasas carbónicas, procaboxipeptidasa y la superóxido dismutasa citosólica. También es un componente esencial del semen y tiene efecto en la motilidad espermática (Hidioglou, 1984). En bajas concentraciones el zinc es importante para la espermatogénesis y es incorporado en el flagelo en espermátidas secundarias y también la encontramos en las fibras densas de la cola del espermatozoide.

Sin embargo, en altas concentraciones inhibe la división y replicación de las células germinales y causa fragmentación de la membrana celular y el núcleo (Fahim *et al.*, 1993; Bloomberg, 1996). Además, parece que juega un papel importante en el control del

metabolismo celular andrógeno. En un estudio se demostró que la actividad de la enzima 5- α reductasa puede ser inhibida por completo por concentraciones de zinc en el orden de 10^{-4} M o más mientras que bajas concentraciones estimulan la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT) (Leatherm, 1970). Conjuntamente con estos hallazgos Fahim *et al.* Mostró que en altas concentraciones el zinc inhibía la unión de la testosterona a la enzima 5- α reductasa y reducía las concentraciones séricas de DHT. En adición a esto Kellokumpu y Rajaniemi demostraron que el zinc inhibe la biosíntesis de testosterona en el testículo de ratas a través del complejo hormona-receptor de la formación de las gonadotrofinas.

La esterilización química, por medio del gluconato de Zinc, se realiza por medio de una inyección en cada uno de los testículos de los perros. El dolor debido a la inyección es mínimo debido al calibre de la aguja (Figura 9). El procedimiento es rápido y toma aproximadamente cinco minutos, no siempre es necesaria la sedación del animal (Yayo, 2004).



Figura 9. Aplicación intratesticular del Gluconato de Zinc

El gluconato de Zinc es un agente necrosante que tiene un efecto local cuando es inyectado en el testículo. Basado en la histopatología de estudios previos, se pueden

observar atrofia de testículos, epidídimo, tubos seminíferos y próstata. La formación de una cicatriz evita también el movimiento del espermatozoides del túbulo seminífero hacia el epidídimo (Shipley, 2004).

ESTUDIOS PREVIOS

Un experimento realizado por Fahim *et al* (1993) (Cuadro 1), donde se evaluó el efecto de la inyección de gluconato de zinc en la cola del epidídimo en caninos adultos observó azospermia a los 90 días post tratamiento. La evaluación histológica del epidídimo y testículo post tratamiento se observó atrofia de túbulos seminíferos, formación de tejido cicatricial y atrofia testicular. En cuanto a la concentración de testosterona plasmática no hubo variación. Wang (2002) evaluó el efecto de la inyección intratesticular de gluconato de zinc en canes con edades entre 10 meses y 2 años y medio observando aspermia, azoospermia y necropermia a los 60 días de iniciado el tratamiento en un 95% de los animales. Posteriormente se evaluó que la concentración de testosterona plasmática se redujo para 41 perros en un 52% de los caninos tratados, por otro lado algunos animales mantuvieron las concentraciones del andrógeno similar al grupo control (Neutersol, 2003; Harper, 2004).

Un medicamento a base de gluconato de zinc lanzado en Brasil fue aplicado en caninos machos adultos jóvenes mostrando también azoospermia, disminución de la motilidad y concentración espermática 12 meses post inyección intratesticular de la droga.

A la evaluación histológica se observó degeneración testicular, disminución de número de células germinativas, atrofia de túbulos seminíferos y pérdida de células de Sertoli. En cuanto a la concentración de testosterona ésta no fue evaluada (Soto *et al.*, 2009).

Oliveira en el 2006 realiza un estudio de seis meses observando azoospermia a los 60 días post inyección y un daño tal del parénquima a la evaluación histopatológica que sugiere un daño irreversible. En el 2012 vuelve a evaluar a 15 caninos tomando en cuenta esta vez los niveles de testosterona en sangre. Logra observar que hay una disminución de niveles de testosterona conforme progresa el tiempo de evaluación, a pesar de ello no hubo

pérdida de libido. Además genero azoospermia a los 63 días de inyección, así como disminución en la concentración espermática.

Cuadro 1. Cuadro resumen de estudios previo de la inyección intratesticular de gluconato de zinc

PRINCIPIO ACTIVO	TAMAÑO MUESTRAL	RESULTADOS	REFERENCIA
Gluconato de zinc con arginina	10 animales (2-3.5 años)	Azoospermia 90 días post inyección.	Fahim et al., 1993
Gluconato de zinc	5 animales (60 días)	Azoospermia en 4 de 5 animales desde el día 21 post inyección, disminución del tamaño testicular (25%), necrosis y atrofia de túbulos seminíferos.	Tepsumethanon et al., 2005
Gluconato de zinc	15 animales: (150 días) -8 meses-4 años (control) -8 meses – 1 año -2 – 4 años	Degeneración de células germinales, atrofia túbulos seminíferos, degeneración grasa en cel. Leydig, hipertrofia de reticuloendoplasmático liso.	Oliveira et al., 2007
Gluconato de zinc con DMSO	15 animales: 4 control y 11 tratamiento (180 días)	Hemograma normal (eosinofilia), disminución de libido, tamaño testicular (24,9-20,9). Azoospermia.	Soto et al., 2009
Gluconato de zinc	15 animales: 5 control y 10 tratamiento	Hemograma y bioquímica normal, disminución de concentración espermática, disminución motilidad, testosterona disminuye, azoospermia (día 7).	Oliveira et al., 2012

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el distrito de San Jerónimo; ubicado a 10 km de la Plaza de Armas de Cusco, perteneciente a la provincia de Cusco, departamento de Cusco. Este distrito se encuentra a una altitud de 3244 m.s.n.m. y cuenta con una extensión de 103340 km² y una población de 28856 habitantes.

El procesamiento de las muestras y el diseño experimental se realizó en el Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con sede en la ciudad de Lima, con la ayuda de un laboratorio comercial para el procesamiento de las muestras de sangre.

3.2 DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

Se utilizaron caninos machos enteros realizando previamente un examen físico completo, incluida la palpación testicular. Los materiales usados fueron:

- Para la inyección del gluconato de zinc: Ketamina, Acepromazina, gluconato de zinc (solución acuosa que contiene 0,2 ml de arginina y 15,0 mg de zinc por ml), jeringas, Guantes y solución de clorhexidina.

- Para la medición del tamaño testicular: Guantes y vernier.
- Para la toma de muestra de sangre: Tubos vacutainer, holders, Aguja, Viales, pipeta, Tips, Algodón, Agua oxigenada y alcohol.
- Para el procesamiento de las muestras de sangre: centrifuga, Kit de ELISA para la medición de testosterona.

3.3 MUESTRAS

El estudio se realizó utilizando las medidas testiculares y muestras de suero recolectadas de los animales de la provincia de San Jerónimo del departamento de Cusco.

3.3.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para el presente trabajo se usó la fórmula de diferencia de medias para estimar el tamaño muestral, estableciendo como mínimo una reducción de 2mm entre el tamaño inicial y el final para considerar como positiva la atrofia testicular. Se trabajó con un nivel de confianza de 95% y un poder del 80%, resultando en el uso de 11 caninos machos como mínimo.

Para la selección de estos animales no se tomó en la cuenta raza ni edad, solo se trabajaron con animales que tuvieron un tamaño testicular no menor de 10mm. Fueron descartados aquellos que presentaron criptorquidismo unilateral o bilateral, alguna enfermedad o malformación en los testículos (incluyendo fibrosis o inflamación de los testículos o epidídimos), antecedentes de reacciones alérgicas hacia algún componente de la fórmula, o dermatitis escrotal preexistente o irritación.

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 INYECCIÓN DEL GLUCONATO DE ZINC

Se procedió a realizar una sedación mínima en los animales, se pre-medicó también con analgésicos y antiinflamatorios y luego se limpió la región escrotal con la solución de clorhexidina diluida.

Para la inyección del gluconato de zinc, se utilizó una jeringa de 1 ml con aguja de calibre 28 y 1/2 o 01 pulgada de longitud para cada testículo. La posición del perro fue dorsoventral tanto para la medida del testículo como para la inyección intratesticular.

La dosis se calculó midiendo el ancho de cada testículo (en su porción más ancha), con un calibrador tipo vernier como se indica en el cuadro 2.

Cuadro 2. Dosis correspondiente al ancho testicular (Arkscience, Manual de aplicaciones).

ANCHO TESTICULAR (mm)	DOSIS POR TESTÍCULO (ml)
10 - 12	0.2
13 - 15	0.3
16 - 18	0.5
19 - 21	0.7
22 - 24	0.8
25 - 27	1.0

Se dosificó cada una de las jeringas con la dosis correcta para ser inyectado en cada testículo de acuerdo con la medida testicular. Se tuvo que mantener el testículo firmemente en la mano (sin apretar) y con la otra mano se aplicó la dosis previamente preparada. Se tuvo que tensar la piel estrechamente encima de cada testículo para evitar inyectar en el saco escrotal o en la piel del escroto. Se inyectó la solución en la porción dorso-craneal de

los testículos al lado de la cabeza del epidídimo para que el producto se difunda en el testículo, rete testis y también en la cabeza del epidídimo (Figura 10). Se inyectó suavemente, ya que al inyectar rápido se podría haber estimulado más la contracción de los túbulos seminíferos y podría haber causado goteras en el sitio de inyección. No debe usarse presión excesiva en la inyección para forzar que el gluconato de zinc entre en el testículo. Si hubiera resistencia se debería interrumpir la inyección inmediatamente. No debe reinyectarse.

El mismo procedimiento se realizó con el otro testículo, es recomendable primero inyectar el izquierdo y posteriormente el derecho para evitar confusión y evitar inyectar dos veces el mismo testículo (Hawkins, 2005).

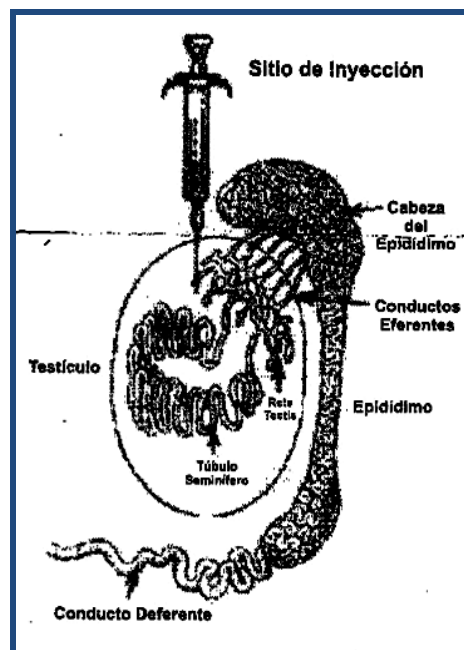


Figura 10. Esquema de sitio adecuado para la inyección del gluconato de zinc (Arkscience, Manual de aplicaciones).

3.4.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

3.4.2.1 MEDICIÓN DE ATROFIA TESTICULAR

La medición del tamaño testicular se realizó midiendo el ancho de cada testículo (en su porción más ancha), con un calibrador tipo vernier (Figura 11). Para el análisis estadístico se considerará una medida previa a la inyección y dos posteriores a ésta (6 meses y al año post inyección).



Figura 11. Vernier para medición de tamaño testicular

3.4.2.2 MEDICIÓN DE TESTOSTERONA

A cada individuo se le extrajo una muestra de sangre por venopunción con un tubo vacío vacutainer usando la vena cefálica, la muestra fue de aproximadamente 3ml en cada punción (0, 6 y 12 meses postinyección).

3.4.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la medición de la testosterona se obtuvo el suero de las muestras de sangre tomadas por el método de centrifugación a 3.500 rpm por diez minutos y se almacenó individualmente en viales a una temperatura de -20°C hasta ser procesados.

Se determinó los niveles de testosterona sérica usando la prueba de ELISA. Dicha técnica se realizó en un laboratorio comercial. Esta hormona tiene un rango normal en el perro adulto de 0,5 a 10 ng/ ml. En el macho castrado, el nivel de testosterona es 0,2 ng/ml.

La prueba cuantitativa de testosterona usada para este estudio se basa en un inmunoensayo enzimático en fase sólida basada en el método de unión competitiva. Una muestra (suero) que contiene una cantidad desconocida de testosterona a ensayar (antígeno no marcado) se añadió a una cantidad estándar de un conjugado de testosterona (antígeno marcado). Los antígenos marcados y no marcados se dejaron para competir por los sitios de unión de alta afinidad de los anticuerpos anti-testosterona recubiertos sobre la placa. La reacción se llevó a cabo cuando se incubó durante 1 hora a 37 ° C. Después de la incubación, se lavó el antígeno libre y se añadió la solución de sustrato TMB y se incubó durante 20 minutos. Tras este periodo se detuvo la reacción añadiendo una solución de parada (HCl 2N) de color azulado. Las absorbancias fueron medidas utilizando un lector de ELISA Stat Fax 2100 el cual genera las mediciones a través de curva estándar ajustada punto a punto. La cantidad de antígeno marcado en la muestra es reversiblemente proporcional a la concentración del antígeno no marcado. Conforme aumenta la concentración en la muestra de la intensidad del color disminuye proporcionalmente. Los resultados para la muestra desconocida se pudieron leer directamente de la curva estándar generada de manera totalmente automatizada.

3.4.4 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Para el análisis de datos se utilizó el programa estadístico Stata 10 de donde se obtuvo resultados de estadística descriptiva tales como media, desviación estándar, intervalo de confianza, mínimo, máximo con los datos obtenidos de las mediciones de tamaño testicular y niveles séricos de testosterona en los tres momentos establecidos.

Los valores observados siendo variables cuantitativas continuas se presentaron gráficamente con BOXPLOT. Se verificó la normalidad de las variables cuantitativas continuas empleando la prueba de Shapiro-Wilk.

La disminución del tamaño testicular en forma porcentual se calculó comparando el tamaño inicial menos el tamaño final dividido entre el tamaño inicial de cada testículo. Además de ello, para determinar si existió diferencia significativa entre el tamaño testicular y los niveles séricos de testosterona en el tiempo (0, 6 y 12 meses) se empleó la prueba de regresiones múltiples con agrupación (cluster) en el identificador del perro. De existir alguna variable que no sea normal se analizaría empleando la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas. Los valores fueron reportados como media \pm intervalo de confianza.

3.4.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

En primera instancia los dueños fueron informados sobre los procedimientos y tratamientos que recibirían sus mascotas. Cada dueño tuvo que leer detenidamente el consentimiento escrito. Al final de la lectura o explicación del consentimiento, cada jefe de familia o su representante en ese momento, tuvo que firmar dicho documento en presencia de la persona que hacía la entrevista.

Además de ello para la inyección del producto se utilizaron los medios para que los animales no sufran innecesariamente y para que se les proporcionó, cuando fue necesario, analgésicos, anestésicos u otros métodos destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia (CNB – CEEA, 2005).

IV. RESULTADOS

Este estudio se realizó con 38 caninos machos enteros de varias edades entre 1 y 10 años cuyo promedio de edad era de $3,2 \pm 2,3$ años en el distrito de San Jerónimo; ubicado a 10 km de la Plaza de Armas de Cusco, perteneciente a la provincia de Cusco, departamento de Cusco. Los caninos se encontraban aparentemente sanos a la evaluación clínica y no se tomó en cuenta la raza y tamaño para dicho estudio.

Las variables cuantitativas continuas medida de testículo derecho, medida de testículo izquierdo y niveles séricos de testosterona siguieron una distribución normal ($P > 0.05$) según la prueba de Shapiro-Wilk.

EVALUACION DE LA VARIABLE TAMAÑO TESTICULAR DERECHO

La figura 12 presenta gráficamente la variable medida de testículo derecho en el tiempo en un gráfico boxplot. La variable también se resume en el cuadro 3 que presenta los promedios, el desvío estándar, mínimo, máximo y los intervalos de confianza.

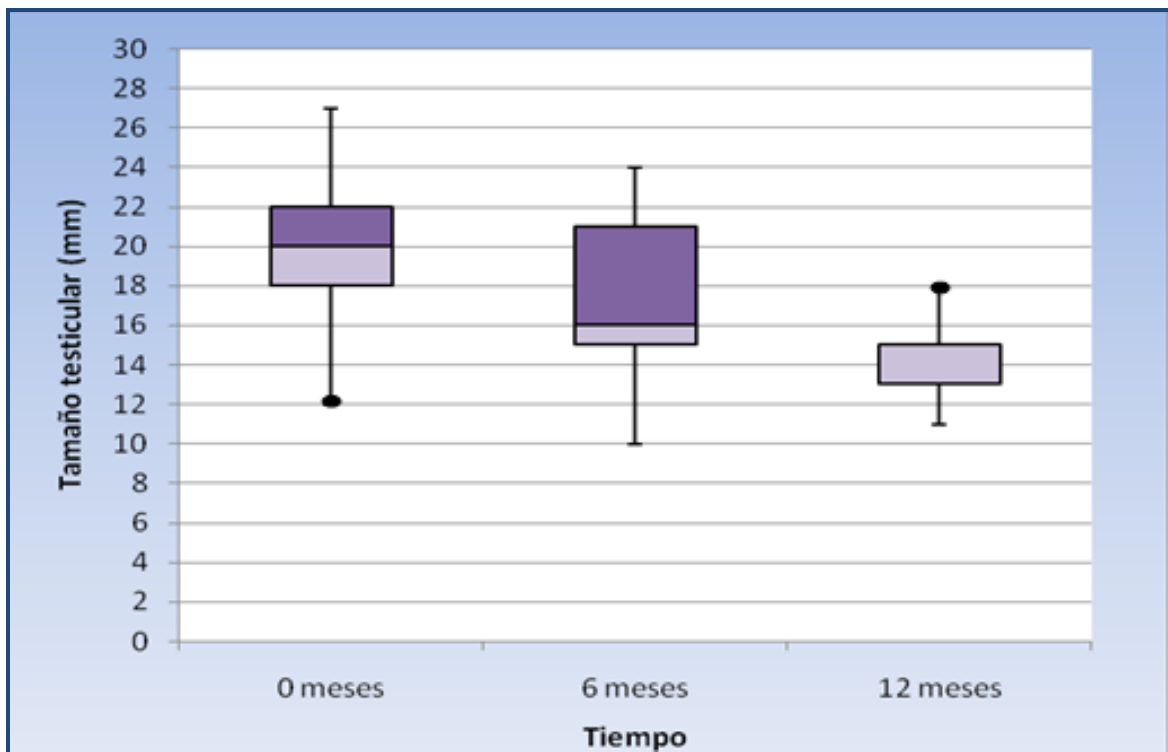


Figura 12. Boxplot de la variable de tamaño testicular derecho evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección.

Podemos observar que el testículo derecho presentaba una media de 19.9 mm (IC 95% 18.8 – 20.9) al inicio del estudio, a los seis meses posteriores a la inoculación fue de 17.5 mm (IC 95% 16.2–18.8) y al año fue de 14.5mm (IC 95% 13.8-15.3) existiendo una diferencia significativa entre tiempos ($p < 0.001$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estadígrafos de la variable de tamaño testicular derecho evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección

TESTICULO DERECHO			
	0 meses	6 meses	12 meses
MEDIA	19.9 ^a	17.5 ^b	14.5 ^c
ERROR ESTÁNDAR	0.54	0.63	0.36
IC	18.8 – 20.9	16.2 – 18.8	13.8 – 15.3
MINIMO	12	10	11
MAXIMO	27	24	18

(^{a, b, c}) Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la misma fila.

IC : representa el intervalo de confianza

EVALUACION DE LA VARIABLE TAMAÑO TESTICULAR IZQUIERDO

El efecto de la inyección de gluconato de zinc en el tiempo sobre el tamaño testicular izquierdo se presenta en la figura 13 mediante un gráfico boxplot y se resume en el cuadro 4 mostrando los promedios, el desvío estándar, mínimo, máximo e intervalos de confianza.

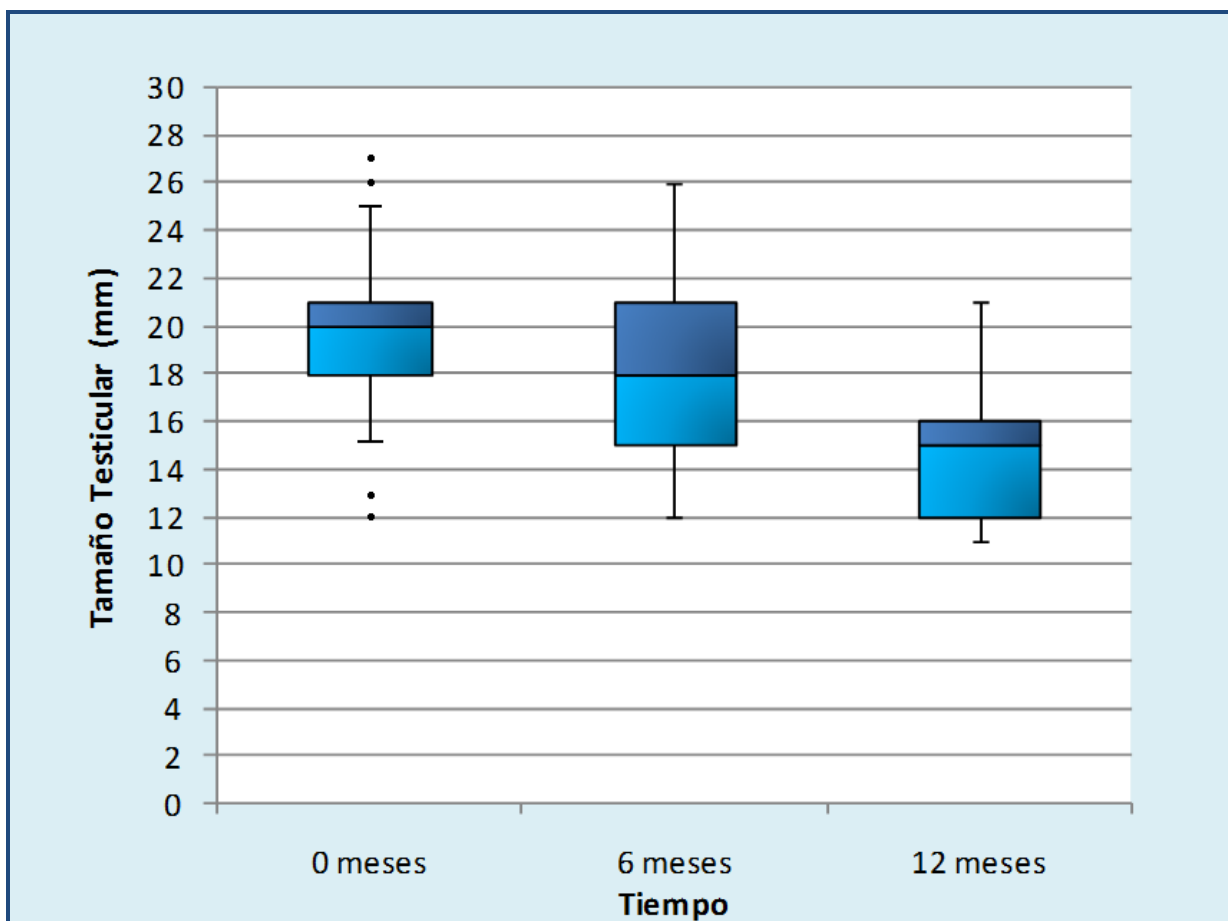


Figura 13. Boxplot de la variable de tamaño testicular izquierdo evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección.

El cuadro 4 nos permite observar que el testículo izquierdo presentaba una media de 19.9 mm (IC 95% 18.8 – 21) al inicio del estudio, a los seis meses posteriores a la inoculación fue de 17.8 mm (IC 95% 16.5–19) y al año fue de 14.32mm (IC 95% 13.3-15.4) existiendo una diferencia significativa entre tiempos ($p < 0.001$).

Cuadro 4. Estadígrafos de la variable de tamaño testicular izquierdo evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección

TESTICULO IZQUIERDO			
	0 meses	6 meses	12 meses
MEDIA	19.9 ^a	17.8 ^b	14.32 ^c
ERROR ESTANDAR	0.56	0.64	0.53
IC	18.8 – 21	16.5 – 19	13.3 – 15.4
MINIMO	12	12	11
MAXIMO	27	26	21

(^{a, b, c}) Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la misma fila.

IC : representa el intervalo de confianza

En resumen podemos observar una disminución general del tamaño testicular tanto derecho como izquierdo, llegando a disminuir 27% de su volumen para el testículo derecho y de 28% en el volumen del testículo izquierdo desde el inicio hasta el final del estudio.

EVALUACION DE LA VARIABLE NIVELES SÉRICOS DE TESTOSTERONA

Por otra parte, se evaluó también los niveles séricos de testosterona en los tres momentos establecidos, los resultados se muestran en la figura 14 mediante un gráfico boxplot y se sumaliza en el cuadro 5 mostrando los promedios, el desvío estándar, mínimo, máximo e intervalos de confianza obtenidos.

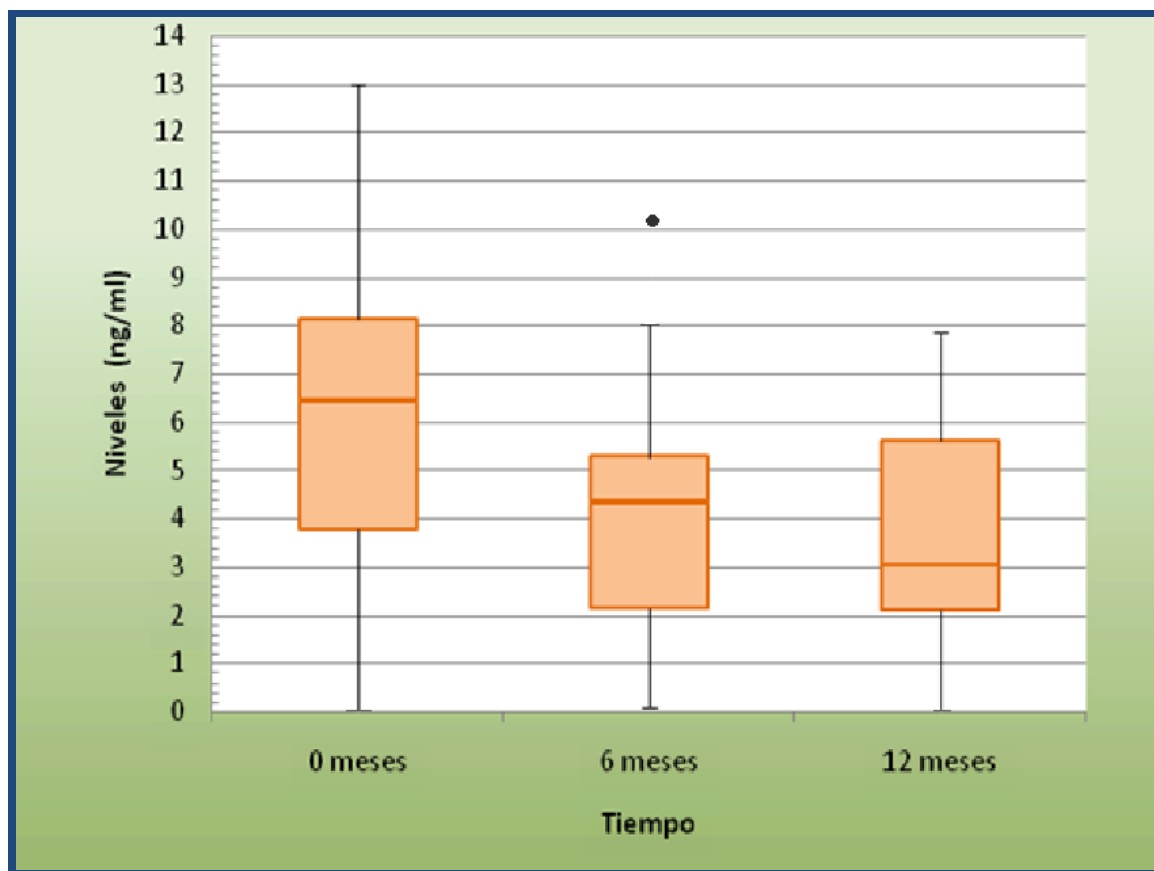


Figura 14. Boxplot de la variable niveles séricos de testosterona evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección.

Podemos observar que también se produce una disminución con el pasar del tiempo mostrando al inicio del estudio una media de 5.9 ng/ml (IC 95% 4.9 – 7.1), a los seis meses posteriores a la inoculación fue de 4.4 ng/ml (IC 95% 3.2–5.5) y al año fue de 3.6 ng/ml (IC 95% 2.2–4.9) existiendo una diferencia significativa entre tiempos ($P=0.003$).

**Cuadro 5. Estadígrafos de la variable de niveles séricos de testosterona
evaluado a los 0, 6 y 12 meses post inyección**

NIVELES SERICOS DE TESTOSTERONA			
	0 meses	6 meses	12 meses
MEDIA	5.9 ^a	4.4 ^b	3.6 ^c
ERROR ESTANDAR	0.54	0.59	0.69
IC	4.9 – 7.1	3.2 – 5.5	2.2 – 4.9
MINIMO	0.025	0.07	0.03
MAXIMO	12.9	10.3	7.9

(^{a, b, c}) Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la misma fila.

IC : representa el intervalo de confianza

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo se realizó en el distrito de San Jerónimo- Cusco utilizando caninos machos que fueron inyectados con la solución de gluconato de zinc a nivel intratesticular y tuvo como finalidad evaluar el efecto en el tiempo (0, 6 y 12 meses) de la inyección intratesticular de gluconato de zinc sobre los valores de tamaño testicular derecho e izquierdo, así como niveles séricos de testosterona.

De los animales incluidos en este estudio solo uno de ellos (2.6%) evidenció inflamación en la región escrotal luego de la inyección con señales de lamido y autotraumatismo; llegando a un punto de necrosis que tuvo que ser solucionada mediante la castración quirúrgica. Dicho porcentaje concuerda con los encontrados en estudios previos (Forzán *et al.*, 2013) que describen hasta un 6% de casos. Las reacciones reportadas en la literatura usualmente se dan, pero no de manera exclusiva, en perros donde se uso una dosis mayor de la recomendada (Levy *et al.*, 2008). Además algunos autores especulan que las reacciones están asociadas a una inapropiada técnica de inyección.

El resto de los animales no evidenció ningún otro signo de incomodidad, ya sea prurito, dolor e inflamación escrotal, solo hubieron algunos signos como decaimiento y ligera inapetencia los siete primeros días posteriores a la inyección del gluconato de zinc como los ya mencionados por Wang en el 2004. Se puede decir que un dolor mínimo ocurrió

durante la inyección, como cualquier aguja que es insertada en la piel que causa dolor somático por un instante. La explicación para el lamido e incomodidad del animal que llega a la castración quirúrgica se puede deber a una incorrecta técnica de aplicación que generó la activación de las terminaciones de los nervios aferentes asociados con sensación de dolor ubicados en la piel del escroto y en la cápsula del testículo y no en el parénquima como tal (Kutzler, 2006). Acorde con la anatomía testicular, el dolor testicular severo es activado por un rápido cambio de presiones en el parénquima testicular. Es por eso la importancia de que al momento de la inyección esta sea aplicada de manera lenta para evitar activar los receptores de presión del testículo (Leoci *et al.*, 2014). En un estudio reciente se señala que la aplicación de acepromacina y meloxicam 30 minutos antes de la inyección intratesticular de gluconato de zinc sería una manera efectiva de reducir o eliminar las molestias durante y después de la inyección (Lorena *et al.*, 2011).

La tendencia general observada en los resultados obtenidos es que los distintos parámetros evaluados (tamaño testicular y niveles séricos de testosterona) después de la inyección de gluconato de zinc fueron disminuyendo conforme se incrementó el tiempo, siendo esta disminución estadísticamente significativa para todos los parámetros evaluados, llegando a reducir en tamaño en un 27% en promedio para el testículo derecho y el izquierdo también lo hizo en un 28%. Solo en uno de los animales se observó una reducción del 50% y es considerada como una reacción propia.

Es bien sabido que altas concentraciones de zinc en el parénquima testicular induce a una reacción inflamatoria que es caracterizada por la presencia de neutrófilos, macrófagos y predominantemente linfocitos CD8 (Russel, 1990). Además, estudios previos muestran que las células inflamatorias mostraron actividad fagocítica y citotóxica elevada después del tratamiento de gluconato de zinc (Wieve, 2009), por lo tanto es razonable concluir que la reacción inflamatoria observada en el parénquima testicular es la responsable de las lesiones en el epitelio de los túbulos seminíferos, la muerte de las células germinativas y la presunta infertilidad. Fahim *et al.* demostraron que altas concentraciones de zinc inhiben la división y replicación de las células germinales y causa fragmentación de la membrana celular y el núcleo (Fahim *et al.*, 1993). Otro estudio demostró que el zinc juega un rol

importante en el control del metabolismo celular andrógeno ya que la α reductasa puede ser inhibida por completo en concentraciones altas dentro del parénquima testicular (Leatherm, 1970). El zinc funciona también como un espermicida natural, y cuando se inyecta en los testículos destruye los espermatozoides existentes tanto en los túbulos seminíferos y el epidídimo. Los túbulos seminíferos vacíos luego colapsan y el proceso de curación crea tejido cicatrizal que bloquea el desplazamiento de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos y rete testis.

Basados en la histopatología reportada por Oliveira donde se pone en manifiesto la atrofia de los túbulos seminíferos y degeneración de células germinales se puede concluir que la inyección resulta en la activación del sistema inmune y de respuesta que genera la ruptura de la barrera de las células de Sertoli y la inflamación localizada con la consecuente liberación de antígenos testiculares (Oliveira *et al.*, 2007). Así mismo se observa la presencia de un tejido de cicatrización cerca al área de inyección del producto debido al incremento del depósito del colágeno intertubular generado por la presencia de fibroblastos activos (Fagundes ,2013) lo que haría que el tejido se contraiga como en cualquier proceso de reparación tisular, dándonos macroscópicamente una reducción el tamaño testicular tal como se pudo observar en el presente estudio.

Así también, como método anticonceptivo ideal lo que se busca es una disminución de los niveles de testosterona y la supresión de la conducta sexual. En el presente trabajo se pudo observar que sí existe una disminución de los niveles séricos con el pasar del tiempo y que sí hay una diferencia significativa pero que esta reducción no llega a ser menor que el rango fisiológico establecido para animales castrados. La disminución necesaria en los niveles de testosterona para disminuir o eliminar la conducta sexual canina nunca ha sido cuantificada (Leoci *et al.*, 2014).

La testosterona es una hormona muy variable en el tiempo y presenta una liberación cíclica por episodios durante el día, en las estaciones del año y posee una vida media variable que va desde los 15 a los 60 días (Albrizio, 2013). Por todo esto existe la probabilidad que algunas variantes como edad, momento del día al tomar la muestra de los caninos en estudio hayan influido en los resultados finales.

Fagundes en el 2013 describe que la inyección de gluconato de zinc induce los cambios estructurales en las células de Leydig así como una necrosis masiva junto con el depósito de colágeno que comprometerían los niveles séricos de testosterona (Fagundes, 2013). Estudios previos denotan que existe una alteración ultraestructural en las células de Leydig después de los 150 días de inyección, en ellos fueron observadas vacuolas citoplasmáticas identificadas como retículo endoplasmático edematizado que resulta ser un mecanismo de defensa ante el daño celular (Oliveira *et al.*, 2007).

Un estudio realizado por Oliveira demuestra que el daño causado por la inyección en el parénquima testicular es similar al observado en una orquitis autoinmune. Otro estudio realizado con ratas usando diferentes tipos de drogas antiinflamatorias y metamizol sódico después de la inyección de gluconato de zinc reveló un retraso en el proceso antiinflamatorio lo que sugiere que el gluconato de zinc podría causar toxicidad a nivel testicular promoviendo la necrosis tisular y no únicamente por la vía inflamatoria (Oliveira *et al.*, 2012).

Una de las limitantes o debilidades del estudio fue la imposibilidad de seguir a todos los animales en su totalidad en los tres momentos establecidos debido a que varios de ellos no fueron encontrados nuevamente por diversas razones como viajes de los dueños, direcciones erróneas, cambio de domicilio, animales fallecidos, etc lo que imposibilitó su evaluación en el tiempo, así como también el difícil manejo de animales agresivos.

Se sugeriría realizar la toma de muestras de sangre de los animales de manera seriada durante el día, con un promedio de tres a seis tomas diarias para poder establecer de manera más certera el comportamiento de los niveles de testosterona en cada animal y evaluar la variación posterior a la inyección del gluconato de zinc.

La esterilización química sería una opción mejor aceptada en nuestra serranía ya que los dueños, sobretodo varones son reacios a retirar permanentemente los testículos del animal con la errónea creencia de que el animal adquiere comportamientos asociados a las hembras. Bloomberg (1996) señala que la inyección intratesticular de agentes químicos al causar atrofia testicular y disminuir la espermatogénesis disminuye también la

concentración de andrógenos pudiendo reducir entonces los trastornos andrógeno-dependientes (Bloomberg, 1996), incluidas las enfermedades de la próstata, el comportamiento indeseable (marcaje con orina, el montaje, la agresión), y enfermedad gonadal y libido (Soto *et al.*, 2007), pero en comparación con nuestro estudio pudimos observar que si bien es cierto que hay una reducción de los niveles de testosterona en algunos animales no llega a los niveles considerados para animales castrados y con ello no previene ningún tipo de comportamiento ni enfermedad andrógeno dependiente coincidiendo con lo señalado por Shipley en el 2004 y Tepsumethanon en el 2005 (Shipley, 2004, Tepsumethanon *et al.*, 2005).

En nuestro país, sobre todo en provincia no existe la cultura de esterilizar a las mascotas especialmente a los machos por lo que es en estos lugares donde más casos de contaminación de calles con excretas, aumento de transmisión de enfermedades zoonóticas a las personas, así como un aumento en los casos de mordeduras a niños son observadas. Es ahí donde entra en juego la esterilización química debido a su fácil aplicación, menor efectos negativos, aplicable a animales con riesgo anestésico alto, generar reacciones inflamatorias menos severas, causar menor estrés al animal y por requerir de menores atenciones luego del procedimiento se convierte en un método que pudiera solucionar o controlar de manera parcial o total este problema. Dentro de las sustancias a poder usarse el gluconato de zinc es el que menos efectos adversos ha parecido generar en el animal y el que ha presentado un auge en su uso en los últimos tiempos. Se sugeriría continuar las investigaciones para evaluar el beneficio de su uso en el control de los trastornos andrógeno dependientes.

VI. CONCLUSIONES

- El parámetro de tamaño testicular evaluado a los cero, seis, y doce meses post inyección intratesticular de gluconato de zinc si tuvo una variación significativa en el tiempo con respecto a los valores iniciales.
- El parámetro de nivel sérico de testosterona evaluado a los cero, seis, y doce meses post inyección intratesticular de gluconato de zinc también varió significativamente con respecto a los valores iniciales.
- La inyección de gluconato de zinc se puede considerar como una técnica capaz de suprimir la espermatogénesis y generar azospermia en caninos machos; sencilla de realizarse, con aparente dolor no detectable y sin efectos negativos en la salud y bienestar del animal.
- La inyección de gluconato de zinc si se puede considerar una alternativa como medio de control poblacional, más no se puede certificar que prevenga otras enfermedades como las hormonodependientes a diferencia de la castración quirúrgica.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Allen, W. E., G. C. W. 1992.** Reproductive endocrinology of the dog. Ed. British Small Animal Veterinary Association, Gloucestershire, United Kingdom. 121-126 p.
2. **Anonimus. 1976.** National Conference on Dog and Cat control: Summary and conclusions. JAVMA, 168: 1125-1134.
3. **Arksciences. 2013.** New York. Best practicing Neutering. [Internet], [18 de Octubre 2013]. Disponible en : <http://www.arksciences.com/>
4. **Baird, G.D, 1972.** Lactation, pregnancy and metabolic disorder in the ruminant. Australian Veterinary Journal 48:680-687.
5. **Bearden J.H. ; Fuquay J. 1982.** Reproducción animal aplicada. Ed Manual Moderno México, D.F. 5-13 p.
6. **Bertschinger HJ, Trigg TE, Jöchle W, 2002.** Induction of contraception in some African wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. Reprod. Suppl., v.60, p.41-52.
7. **Blank H.I.J.1994.** El maravilloso mundo de los perros, México: Ed. Trillas. 247- 248 p.
8. **Bloomberg MS. 1996,** Surgical neutering and non-surgical alternatives. J Am Vet Med Assoc; 208:517–519.
9. **Bojrab Joseph M., 1993.** Técnicas actuales en cirugía de animales pequeños. 3era Ed.Madrid : Intermédica. 917 p.
10. **Cedillo V.G, Vargas Pino F, Monroy O.V, 2006;** Results of the massive sterilization Project using gluconate neutralized with arginine in male dogs living in the States of Hidalgo and Puebla, Mexico, 15-20 p.
11. **CEEA-CNB Comité Ético De Experimentación Animal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Centro Nacional De Biotecnología, 2005,** Reglamento Interno Del Comité Ético De Experimentación Animal Del CNB.2p.

- 12. Chastain C.B., Ganjam V.K., 1986.** Clinical Endocrinology of companion animals. Philadelphia : Lea y Febiger. 568p.
- 13. Chiaroni J. 1998.** Terminologie numerique des antigenes de groupes sanguins erythrocytaires. Transfus Clin Biol. 5: 366-371.
- 14. Christiansen YJ. 1988.** Reprodução no cão e no gato. São Paulo: Ed. Manole. 362 p.
- 15. Concannon P.W, Meyers-Wallen V.N, 1991.** Current and proposed methods for contraception and termination of pregnancy in dogs and cats. J Am Vet Med Assoc; 198:1214–1225.
- 16. Crowther John R. 2009.** The Elisa Guidebook. 2° ed. New York. Humana Press. 562 p.
- 17. Cunningham J.G. 2003.** Fisiología veterinaria. 3ª ed. Madrid: Elsevier. 576 p.
- 18. Dooley, M.P., Pineda M.H. 1984.** Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cats. Am. J. Vet. Res. 47:286-292.
- 19. Endocrine Technologies, Inc. 2012.** USA. [Internet], [21 de diciembre del 2012]. Disponible en : <http://endocrinetech.com/>
- 20. Engelhardt W.V., Breves G. 2005.** Fisiología veterinaria. 1ª ed. España: Acribia. 704 p
- 21. Evans H; Lahuenta A., 1997.** Disección del perro, 4ta Edición. Ed. España: McGraw-Hill. 181-183 p.
- 22. Fagundes A.K, Melo C.C, Nery L.T, Rêvoredó R.G, Andrade T.F. 2013.** Intratesticular injection of a zinc based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial of efficacy and safety. Vet J.;197:307–310
- 23. Fahim M.S, Wang M, Sutcu M.F, Fahim Z, Yougquist R.S, 1993,** Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. Contraception; 47:107–122.
- 24. Faulkner L.C. 1975,** Dimensions of the pet population problem. JAVMA; 166:477-478.

25. **FAWEC. 2005.** Barcelona: Farm Animal Welfare Education Centre.[Internet], [05 de Marzo del 2013]. Disponible en : <http://www.fawec.org/>
26. **Fayrer-hosken R.A, Dookwah H.D, Brandon C.I. 2000.** Immunocontrol in dogs. Anim. Reprod. Sci., v. 60-61, p. 365-373.
27. **Feldman E.C, Nelson R.W, 2000.** Endocrinología y reproducción en perros y gatos. 2ª ed. México: McGraw-Hill. 866 p.
28. **Foote R.H, Swierstra E.E, Hunt W.L. 1972.** Spermatogenesis in the dog. Anat Rec 173: 341-351 p.
29. **Fossum T.W., 2008,** Cirugía en pequeños animales, 3era ed. España: ElSevier. 1631 p.
30. **Fozán M. J., Garde E.,Perez G.E., Vanderstichel R.V., 2013.** Necrosuppurative Orchitis and scrotal necrotizing dermatitis following intratesticular administration of zinc gluconate neutralized with arginine (Esterilsol) in 2 mixed breed dogs. Veterinary Patology Vol 51(4): 820-823.
31. **Fundación Altarriba. 2007.** Madrid. [Internet],[08 de Agosto del 2005]. Disponible en : <http://bienestaranimal.altarriba.org/>
32. **Galván Pérez, M. del R. 1994.** Esterilización en el perro por inyección del metilcianoacrilato en la cola del epidídimo, Rev. Vet. Méx., 25, 3.
33. **García A., 1995.** Fisiología veterinaria. Madrid.Ed. Interamericana Mc Graw Hill p. 770.
34. **Getty R. 1981.** Anatomía de los animales domésticos. 5ª ed. Río de Janeiro: Interamericana. 2000 p.
35. **Gutter V. 2005.** Análisis de algunas características de la población canina relacionadas con mordeduras e hidatidosis humana en la provincia de Valdivia. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia: Universidad Austral de Chile. 60p.
36. **Guzmán Vásquez E. 2004.** Las pruebas de Elisa. Gaceta Médica México Vol.140 (3) 48-49.
37. **Hafez E.S.E. 2002.** Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: MacGraw-Hill. p 441-452.

- 38. Hales D.B., Sha and A.H.Payne. 2005.** Testosterone inhibits cAMP-induced de Novo synthesis of Leydig cells cytochrome P-450_{17α} by an androgen receptor-mediated mechanism. J.Biol.Chem. 262(23): 11200-11206.
- 39. Harper C.** Neutersol: Chemical sterilization for dogs. 2004. En: Proceedings of the Caribbean Animal Welfare Conference. Best Practices in Humane Control Stray and Feral Dog and Cat Population. p. 20-25.
- 40. Hawkins. 2005.** Posición rápida respecto a Neutersol. [Internet],[25 de Setiembre del 2010]. Disponible en : <http://www.neutersol.com/>
- 41. Herath C.B, Jin W, Watanabe G, Arai K. 2004.** Adverse effects of enviromental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats, Endocrine 25, 163-172.
- 42. Hidirolou M, Knipfel J.E.1984.** Zinc in mammalian sperm: a review. J Dairy Sci ; 67:1147–1156.
- 43. Hooker C.W., 1965.** The intertubular tissue of the testis. Z.mirk-anat. Forsch. 72, 462-438.
- 44. Ibarra L., Morales M.A., Acuña P.,** Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias de la universidad de Chile, Aspectos demográficos de la población de perros y gatos en la ciudad de Santiago [Internet]. [2003]. Disponible en: <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl>
- 45. Illera, M. 1994.** Glándulas Adrenales. Testículo y Sistema Reproductor Masculino En Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción, Madrid. Ed. Colibac. p. 146-183, 209-233.
- 46. Immegart H.I, Threlfall W.R. 2000,** Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterelization of dogs. Am J Vet Res; 61: 544
- 47. Inaba T, Umehara T, Mori J, et al. 1996.** Reversible supression of pituitay-testicular function by a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). Theriogenology, v. 46, p. 671-677.
- 48. Joechle W. 2004,** History of non-surgical contraception with drugs in dogs and cats..

In: Second international symposium by ACC&D on non-surgical contraceptive control in cats and dogs; p. 144–9.

- 49. Johnston S.D, Kustritz M.V.R, Olson P.N.S. 2001.** Canine and feline theriogenology. Philadelphia: Ed. W.B.Saunders. 592 p.
- 50. Junaidi A., Williamson PE, Cummins J.M., 2003.** Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin- releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long- term contraception in male dogs. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.15, p.317-322.
- 51. Kawakami E, Tsutsui T, Ogasa A. 1991.** Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. *J Vet Med Sci* 53: 241-248.
- 52. Kawakami E, Vande Voort C.A, Mahi-Brown C.A, Overstreet J.W. 1993.** Induction of acrosome reaction of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol Reprod* 48: 841-845.
- 53. Kellokumpu S, Rajaniemi H. 1981.** Effect of zinc on the uptake of human chorionic gonadotropin (LCG) in rat testis and testosterone response in vivo. *Biol Reprod*; 24:298.
- 54. Knol, B. W., Dieleman S. J.,Bever M. M.,Van den brom W. E.. 1993.** GnRH in the male dog: dose-response relationships with LH and testosterone. *J. Reprod. Fert.* 46: 159-161.
- 55. König H. E., Liebich H.G. 2005.** Anatomía de los animales domésticos. 2da Ed. Médica Panamericana. 400 p.
- 56. Kutzler M., Wood A. 2006.** Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*. 66(5): 14–525.
- 57. Laing J.A. 1988.** Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria 4ta Ed. Madrid, España: Mc Graw Hill, 131-137 p.
- 58. Leathem J.H., Johnson A.D, Gomes M.R, Vandemark N.L .1970.** Nutrition in the testis, vol. 3. New York: Academic Press.

- 59. Leoci R., Aiudi G., Silvestre F., Lissner E. A., Lacalandra G. M.. 2014.** Alcohol diluents provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 56: 62.
- 60. Leonard A, Gerber G.B, Leonard F. 1987.** Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mutat Res*.168 : 343–348.
- 61. Leyva Ocariz H.,Stabenfieldt G., Munro C., Arteaga M., Orbuz B., Diaz M., Hernandez I. 1993.** Endocrinología de cabras criollas ovidectomizadas y mestizas en zonas semiáridas de Venezuela. *Revista Científica FCV-LUZ*. Vol III (2) 157-164.
- 62. Levy J.K. , Crawford C, Appel L.D., 2008.** Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. *Am J Vet Res*. 69(1):140–143.
- 63. Lorena SERS, Luna SPL, Rodrigues D, Lima AF. FMVZ, UNESP, Botucatu.** Avaliação algica do gluconato de zinco injetado por via intratesticular para a contracepção química em cães. [Internet]. [19 de Abril del 2011]. Disponible en: <http://www.infertile.com>.
- 64. Losno W, Coyotupa J. 1977.** Influencia del macho sobre la progesterona y 17 b-estadiol séricos de alpacas hembras en quietud sexual. *An 8' Jorin Peruana Endocrinol. Perú*
- 65. Lubos H., 1987.** Bases biológicas de la reproducción Bovina. México. Ed. Diana. p. 47-53.
- 66. Matamoros, Gomez, Andaur, 2002.** Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria.*Arch. Med. Vet. N °2*: 167-182.
- 67. Mc Donald L.E. 1991,** Reproducción y Endocrinología Veterinaria, México. Ed. Interamericana. p.201-234.
- 68. Moore, J.A ; Kakuk, T.J. 1969.** Male dogs naturally infected with *Brucella canis*. *J.Amer.vetjned. Ass.*, 155:1352-1358.
- 69. Neutersol.** Dose Determination Study. Freedom Information Summary. NADA 141-217.United States Food and Drug Administration, 2003.

- 70. Nishimura N, Kawate N, Sawada T, 1992.** Chemical castration by single intratesticular injection of lactic acid in rats and dogs. *J. Reprod. Dev.*, v. 38, p. 263-266.
- 71. Oliveira E.C.S, Moura Maria Raquel, Valdemiro A, Silva Jr, Peixoto C., Saraiva K., Cavalcanti M. J., Douglas R, De Pinho A., 2007.** Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. *Science Direct, Theriogenology* 68: 137–145.
- 72. Oliveira E.C.S, Moura Maria Raquel, Valdemiro A, Silva Junior, Kastelic John P., Douglas Robert H., Marques Junior Antonio P., 2012.** Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of zinc gluconate-based solution. *Direct, Theriogenology* 77: 1056-1063.
- 73. Ortega-Pacheco A, Rodríguez-Buenfil JC, Leal-Ortega J. 2000,** Actividad estral de perros callejeros en la ciudad de Mérida y su relación con edad, tamaño y condición corporal. *Rev Biomed*; 11:107-112.
- 74. Payro D.J.L., 1981,** El perro y su mundo. Ed Loera Chavez Hnos. y Cía; p 159-161.
- 75. Philippe Vingler P., Kermici M., Krien P., 1991.** Direct quantitative digital autoradiography thin layer chromatography of $3\alpha,3\beta$ - and 5α -reduced and 17β -dehydrogenated androgens derived from testosterone metabolism. *Journal of chromatography*, 571: 73 – 86.
- 76. Pineda M.H, Reimers T.J, Faulkner L.C, Hopwood M.L, Seidel G. 1977.** Azoospermia in dogs induced by injections of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. *Am J Vet Res*, 38: 831-8.
- 77. Raichle T.L., Paranto M.E. 1994.** Modern blood banking and transfusión practices. Philadelphia:FA Davis; p.256-75.
- 78. Romagnoli S. E. 1991.** Canine cryptorchidism. *Journal Vet. Clin. North Amer. Small Anim. Pract.* 21: 533- 544.
- 79. Romagnoli S, Geretto N, Stelletta C.,2010.** Prolonged Suppression of Reproductive Activity in Male Cats with a 4.7 Mg Implant of Deslorelin. En: *International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control*. 4.

- 80. Russel L.D, Ettlin R.A, Sinhahikin A.P, Clegg E.D. 1990.** Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, FL: Cache River Press; 286p.
- 81. Sabot J.F., 1985,** Determination of plasma testosterone by mass fragmentography using [3,4-¹³C]testosterone as an internal standard . Journal of chromatography 339:233.
- 82. Schneider R. 1975,** Observations on overpopulation of dogs and cats. JAVMA; 167: 28.
- 83. Setchell,B.P. 1977,** Spermatogenesis and spermatozoae . En: Germ cells and fertilization. Reproduction in mammals. Gran Bretaña. Ed. C.R. Austin y R.V. Short. p 63-101.
- 84. Shipley, 2004.** Illinois: University of Illinois. [Internet]. [16 de Febrero 2004]. Disponible en : <http://www.cvm.uiuc.edu>
- 85. Sino Biological Inc. 2007.** Pekín. [Internet], [23 de Agosto del 2007]. Disponible en : <http://www.sinobiological.com/>
- 86. Soto, WG Viana, Mucciolo, Hosomi, Vannucchi, Mazzei, Eyherabide, C. de Fátima Lucío, Dias, SS de Azevedo.2009.** Evaluation of Efficacy and Safety of Zinc Gluconate Associated with Dimethyl Sulphoxide for Sexually Mature Canine Males Chemical Neutering. Journal compilation 44: 927-931.
- 87. Tepsumethanon V, Wilde H, Hemachudha T, 2005.** Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs. J Med Assoc Thai 88, 686–689.
- 88. Trigg TE. 2004.** Advances in use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. In: International Symposium on Canine and Feline Reproduction 5, p.49-51.
- 89. Ueshiba H, Segawa M, Hayashi T, Miyachi Y, Irie M.1991.** Serum profiles of steroid hormones in patients with Cushing's syndrome determined by a new HPLC/RIA method. Clin Chem. 37(8):1329-33.
- 90. Wang M. 2004.** Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: Second international symposium by ACC&D on nonsurgical contraceptive control in cats and dogs; p. 165–169.

- 91. Wang. 2004.** Aprobación de la FDA a la primera droga para la esterilización de perros. [Internet], [20 de Setiembre del 2005]. Disponible en : [http:// www.neutersol.com/](http://www.neutersol.com/)
- 92. Wiebe V.J, Howard J.P. 2009.** Pharmacologic advances in canine and feline reproduction. Theriogenology; 24:71
- 93. Yayo V, 2004.** México: Fundación Luca A.C. [Internet]. [20 de Setiembre 2005]. Disponible en : <http://fundacionluca.org.mx>

ANEXOS

ANEXO 1

CANINE TESTOSTERONE ELISA TEST KIT

PRODUCT PROFILE AND INSTRUCTIONS

INTENDED USE

The Microwell Testosterone ELISA is an enzyme immunoassay system for quantitative determination of Testosterone levels in Canine and related species serum/plasma. The test is intended for professional use as an aid in the diagnosis and monitoring of conditions related to serum Testosterone. The test kit is designed to be used by a trained, skilled professional only.

INTRODUCTION

Testosterone is a steroid hormone with secreted from the Leydig cells of the testis in the male, adrenals and the ovaries. The dihydro derivative of Testosterone exerts a potent anabolic action responsible for the post pubescent growth rate and subsequent muscle and bone tissue maintenance of adult males. Testosterone assays are of significance in a number of endocrine dysfunction as adult Leydig cell or seminiferous cell failure. Testosterone levels in serum may be raised by certain drugs such as 19-nortestosterone, epitestosterone, ethisterone and Danazol.

TEST PRINCIPLES

The Testosterone quantitative test is based on a solid-phase enzyme immunoassay based on competitive binding method. A sample (serum/ plasma/urine) containing an unknown amount of Testosterone to be assayed (unlabeled antigen) is added to a standard amount of a conjugated Testosterone (labeled antigen). The labeled and unlabeled antigens are then allowed to compete for high affinity binding sites of anti- Testosterone antibodies coated on to the plate. The reaction takes place when incubated for 1 hours at 37C, during this period a bio-specific reaction takes place After incubation , wash away the free antigen and add TMB substrate solution and incubated for 20 minutes, a blue color developed will be

stopped with a stop solution (2N HCl). Absorbencies are measured at 450 nm using ELISA plate reader. A standard curve is produced using values from standards from which absorbency values for blank tubes have been subtracted. The amount of labeled antigen in the sample is reversibly proportional to the concentration of the unlabeled antigen. As the concentration increases in the sample the color intensity decreases proportionately. The results for unknown may be read directly from this standard curve using either manual calculation or by a suitable computer program. This kit is suitable for the direct measurement of Testosterone in serum samples. It may also be used following an extraction procedure, for assaying urinary Testosterone.

Materials Provided

1. Microtiter wells coated with anti testosterone antibody
2. Enzyme-labeled Testosterone reagent, 12mL
3. Testosterone reference set: 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 10, 20ng/mL
1. QC1 (~ 0.5ng/mL) and QC2 (~2.0ng/mL).
4. TMB Color Reagent, 12mL
5. Stopping Solution, 6 mL
6. 20 X Wash Buffer, 20 mL.
7. Instructions

Materials Required But Not Provided

1. Semiautomatic pipettes: 20ul and 200ul
2. Disposable pipette tips
3. Microtiter plate shaker
4. Microtiter well reader.
5. Plate washer
6. Absorbant paper
7. 37 C incubator
8. Parafilm to cover plate
9. Distilled water

PRECAUTIONS

1. This kit contains reagents manufactured from animal blood components. The source materials have been tested by immunoassay for hepatitis B surface antigen and antibodies to HIV virus and found to be negative. Nevertheless, all blood products and samples should be considered potentially infectious and handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate biohazard safety guideline or regulations in your state.

2. The contents of this kit, and their residues, must not come into contact with ruminating animals.
3. Avoid contact with the Stopping Reagent. It may cause skin irritation and burns.
4. Reagents contain sodium azide (NaN₃) as a preservative.
1. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up.

STORAGE & STABILITY CONDITIONS

1. Store the kit at 2-8 C upon receipt and when it is not in use. **Do not Freeze.**
2. Keep microtiter wells in a sealed bag with desiccants to minimize exposure to damp air.
3. Allow all the reagents to reach to room temperature before setting up the assay.
4. Remove only desired number of wells and seal the bag and store at 2-8 C as before.

INSTRUMENTATION

A microtiter well reader with bandwidth of 10 nm or less and an optical density range of 0 to 3 OD or greater at 405 nm wavelength is acceptable for use in absorbency measurement.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1. This kit is suitable for use with serum or heparin plasma samples. The use of hemolytic or lipemic samples and samples with bilirubin will affect results and may interfere with the assay.
2. No special preparation of the samples is required. Avenous blood sample (enough to produce about 0.5 ml serum) is collected aseptically.
3. If the sample is not tested immediately refrigerate at 2-8 C. If the storage period greater than 3 days are anticipated, the specimen should be frozen and repeated thawing and freezing should be avoided.
4. If the sample is turbid or contain precipitate may give false results. Such samples should be centrifuged before use.

REAGENT PREPARATION

1. Prepare Wash buffer by diluting 1 part with 19 parts of distilled water, excess amount may be stored at 2-8 C for couple of weeks.
2. Dilute highly concentrated specimen samples with sample dilution buffer and mix well before use in the assay.

ASSAY PROCEDURE

1. All reagents should be allowed to reach room temperature (18-25C) before use.
2. Pipette 10 ul of standards, samples, and controls into appropriate wells.
3. Add 100 ul of Testosterone Enzyme Conjugate Solution to each well (except those set for blanks).
4. Incubate at 37C for 1 hour. You may use parafilm to cover the wells or use appropriate zip-lock bag to store the plate during the incubation.
5. Discard the contents of the wells and wash the plate 5 times with Wash Solution (250-300ul) per well. Invert plate, tap firmly against absorbent paper to remove any residual moisture.
6. Add 100 ul TMB color into each well (including the blanks). Remember for pipetting order.
7. Incubate the plate for 20 minutes at room temperature.
8. Stop reaction by adding 50ul of Stopping Solution to wells in the same sequence that the Substrate Solution was added and gently mixed.
9. Read the absorbance at 450 nm with a microwell reader.

NOTE: The substrate incubation should be carried out within the temperature range 20-25C. For temperature outside this range, the duration of the incubation should be adjusted.

CALCULATIONS

1. Calculate the mean absorbance values (A) for each set of reference standards, controls, samples and blanks.
2. Subtract the value for blanks from those for standards, control and unknown samples.

3. Calculate the B/B)% values by dividing each value by the value for the zero-standard.
4. For the standards, plot a graph on semi-log graph paper with B/BO% values on the ordinate and the Testosterone concentrations (pg/mL) on the abscissa.
5. Using the graph read off the Testosterone concentrations for the unknown samples.
6. The values above the readable and below the readable range should be repeated using appropriate dilution.

SENSITIVITY & EXPECTED VALUES

The sensitivity of the assay is 20pg/mL and each clinical laboratory should establish its own normal range based on the experience and animal condition, species and different breeds.

QUALITY CONTROL

Good Laboratory practice requires that quality control specimens be run with each standard curve to establish assay performance characteristics such as recovery, linearity, precision and specificity. The average recovery in this assay is in the range of 96.6%. The recovery in the linearity range is about 98.5% and the linear range of the assay is 0-1000pg/mL. The intra-assay variation 9.3% and inter assay variation is about 9.6% The specificity was assessed by determining the crossreactivity of several known steroids in the assay and found less than 0.4% with androsterone and 0.25% with corticosterone but others showed no significant cross reactivity.

LIMITATIONS OF THE TEST

1. The Testosterone ELISA system designed here is for estimation of Testosterone levels in Canine and related species samples only.
2. The wells should be adequately washed to obtain reproducible results. The washing step is extremely important and should be followed according to the instructions.
3. The assay should be performed by trained and skilled professional only.

Limitations & Warranty

The present ELISA is designed for helping the scientist to analyze test samples only. There are no warranties, expressed, implied or otherwise indicated, which extend beyond this description of this product. Endocrine Technologies, Inc. is not liable for property or laboratory damage, personal injury, or test samples loss, or economic loss caused by this product. Warranty is limited to replacement of similar ELISA Kit damaged during shipment or leaking solutions within 30 days, with written explanation and return of the ELISA product. The analyst should establish the standard curve and a small number of samples before proceeding to analyze a large number of samples.

REFERENCES

1. Soderberg SF 1986 canine Breeding Management" Vet Clin North Am Small Anim May 16(3) p419-433
2. Goodman MF 1992 Canine Ovulation timing. Probl Vet Med 4(3) 433-444
3. Knobil, E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle, Rec. Prog. Horm. Res. 36:52-88; 1980
4. Harris, G.W. and Naftolin. The hypothalamus and control of ovulation. Brit. Med. Bullet. 26: 1-9; 1970
5. Shome, B. and Parlow, A.F. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:199-205; 1974
6. Uotila, M.; Ruoslahti, E. and Engvall, E. J. Immunol. Methods. 42: 11-15; 1981
7. Chatteraj SC 1976 Endocrine function in Fundamentals of Clinical Chemistry, NW Tietz eds, WB Saunders Chap 13, 699-823
8. Tietz 1970 Fundamentals of Clinical Chemistry
9. Sobel CS et al. J Clin Endo 1958 18, 208
1. 10 J Clin Endocrinol Metab 42, 679 1976
10. Korenman SG et al. 1987 Clin Res 35, 182A
11. Wilke TJ & Utley DJ 1987 Clin Chem 33, 1372-137

ENDOCRINE TECHNOLOGIES, INC. USA www.endocrinetech.com

Canine Testosterone ELISA Test Kit

Product Profile and Instructions

35325 Fircrest Street, Newark, CA 94560-1003 * Phone (800) 745-0843 * (510) 745-0844

* Fax (510) 745-0977

DATOS PERSONALES

TÍTULO TESIS : Evaluación En Campo De La Castración Química En Perros Usando
Gluconato De Zinc

TÍTULO CORTO : Evaluación De La Castración Química En Perros

NOMBRE : Theresa Betsabé Tataje Arancibia

DNI : 70240225

E-MAIL : theresatataje29@gmail.com

TELF : 996-233839

DIRECCIÓN : Mz. A Lote 9, 2da Zona Huampani Alto- Lurigancho Chosica– Lima

